Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. Werther Schneider
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ÜBER NACHWEISMETHODEN DES HB_sAg

INAUGURAL–DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Scheerer
geb. Pittroff
aus München

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0059

Aus der Abteilung für Transfusionswesen mit Blutbank
Direktor: Professor Dr. Werther Schneider
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ÜBER NACHWEISMETHODEN DES HB_sAg

INAUGURAL–DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ursula Scheerer
geb. Pittroff
aus München

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. R. Lempp
Berichterstatter: Professor Dr. W. Schneider

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Entdeckung, klinische Bedeutung und Nomenklatur des HB_sAg	01
2.	Bedeutung des HB_sAg Nachweises	06
2.1.	Impfstoffentwicklung	06
2.2.	Diagnostik der Hepatitis	06
2.3.	Seuchenhygiene	07
2.4.	Hämodialyse	08
2.5.	Die Posttransfusionshepatitis	09
3.	Natur und Eigenschaften des HB_sAg	13
3.1.	Morphologie des Hepatitis B Virus (HBV)	13
3.2.	Immunologische Differenzierung des HB_sAg	15
3.3.	Physikalische Eigenschaften	15
3.3.1.	Einleitung	15
3.3.2.	Molekulargewicht	16
3.3.3.	Sedimentationskonstante	16
3.3.4.	Diffusionskoeffizient	18
3.3.5.	Dichte	18
3.3.6.	Elektrophoretische Beweglichkeit	20
3.3.7	Absorptionsspektrum und Extinktionskoeffizient	20
3.3.8.	Beständigkeit gegen Hitze und Kälte	21
3.4.	Chemische Eigenschaften	21
3.4.1.	Zusammensetzung nach den färberischen Eigenschaften	21
3.4.2.	Proteingehalt	22

3.4.3.	Polypeptidketten	22
3.4.4.	Aminosäurezusammensetzung	23
3.4.5.	Nukleinsäure	23
4.	Nachweismethoden	26
4.1.	Elektronenmikroskopie	26
4.2.	Immunodiffusion	27
4.3.	Komplementbindungsreaktion	28
4.4.	Überwanderungselektrophorese	29
4.4.1.	Lochgröße, Lochabstand	30
4.4.2.	Puffer	31
4.4.3.	Gel	31
4.4.4.	Antikörper	32
4.4.5.	Besonderheiten und Empfindlichkeit der Methode	32
4.5.	Radioimmunassay	33
4.6.	Hämagglutinationshemmung und passive Hämagglutination	34
4.7.	Andere Tests	39
4.8.	Empfindlichkeitsvergleich	40
5.	Experimenteller Teil	41
5.1.	Vorbemerkungen	41
5.2.	Methoden und Material	41
5.2.1.	Nachweismethoden	41
5.2.2.	Untersuchungsmaterial	41
5.3.	Technik der Methoden	42
5.3.1.	Hämagglutinationsmethoden	42
5.3.1.1.	Auscell	42
5.3.1.1.1.	Screening- Test	43

5.3.1.1.2.	Spezifitätstestung	46
5.3.1.2.	Hepanosticon	49
5.3.1.2.1.	Arbeitsanleitung für den Screening-Test	49
5.3.1.2.2.	Spezifitätstestung	50
5.3.2.	Überwanderungselektrophoresen	52
5.3.2.1.	Methode nach Pesendorfer	52
5.3.2.1.1.	Screening-Test	52
5.3.2.2.	Elektrophoretische Schnellmethode nach Sugg	54
5.3.2.3.	Spezifitätstestung	55
5.4.	Untersuchungsergebnisse	56
5.4.1.	Vergleich der positiven Ergebnisse	56
5.4.2.	Spezifität	57
5.4.3.	Empfindlichkeit der Methoden	58
5.4.4.	Empfindlichkeitsfaktoren	59
5.4.5.	Tabellen	60
6.	Diskussion	67
6.1.	Diskussion der Ergebnisse	67
6.2.	Problem der Posttransfusionshepatitis	69
6.2.1.	Spender-Empfänger-Relation	69
6.2.2.	Empfindlichkeit der Methoden und Infektionstiter	69
6.2.3.	Spenderpopulation	70
6.2.4.	Krankenhaushygiene	72
7.	Zusammenfassung	73
8.	Literaturverzeichnis	74

1. Entdeckung, klinische Bedeutung und Nomenklatur des HB_sAg

Die Hepatitis ist als Krankheit in der Geschichte der Medizin schon lange bekannt. 1884 beschrieb LÜRMANN eine Gelbsuchtepidemie bei Werftarbeitern in Bremen, die mit menschlicher Lymphe gegen Pocken geimpft wurden. Er vermutete, daß die Epidemie durch eine Infektion entstanden ist (101).
Im ersten Weltkrieg war die infektiöse Hepatitis bei den britischen Truppen weit verbreitet, was man auf eine faecal-orale Infektion zurückführte (103, 108).
1937 und später traten in Groß-Britannien Gelbsuchtepidemien nach Masern- und Gelbfieberimpfung auf (42, 43, 142). Das erstaunliche an diesen Epidemien war die unerwartet lange Inkubationszeit, mit 2 - 6 Monaten viel länger als bei der sogenannten epidemischen catarrhalischen Gelbsucht. Eine ähnlich lange Inkubationszeit hatte LÜRMANN schon 1884 beschrieben (101).
Die zahlenmäßig wohl bedeutendste Epidemie einer Hepatitis mit langer Inkubationszeit trat im Weltkrieg II in den USA auf, als nach einer Gelbfieberimpfung mehr als 5 000 Angehörige der Armee erkrankten (63, 150).
Da alle Versuche, die Krankheit auf Labortiere zu übertragen zunächst fehlschlugen, begann man in den vierziger und fünfziger Jahren mit Freiwilligenuntersuchungen. Diese Untersuchungen (67, 102, 120, 129) brachten erstmals den Beweis, daß es zwei Hepatitisarten gibt, eine Hepatitis A und eine Hepatitis B.
Die Hepatitis A, früher als infektiöse Hepatitis, akute catarrhalische Gelbsucht oder als epidemische Gelbsucht bezeichnet, hat eine kurze Inkubationszeit (15 - 40 Tage) und wird im allgemeinen faecal-oral übertragen. Das Virus (Hepatitis A Virus) wird mit den Faeces ausgeschieden.

Die Hepatitis B dagegen, auch Serumhepatitis genannt, hat eine Inkubationszeit von 20 - 180 Tagen und wird hauptsächlich parenteral übertragen, jedoch ist auch ein oraler und venerischer Übertragungsweg möglich (66, 90).
Der wichtigste klinische Beweis für zwei unterschiedliche Erregertypen waren die Willow Brook Experimente von KRUGMAN (89). Bei diesen Übertragungsexperimenten an Geistesschwachen wurde festgestellt, daß Patienten mit durchgemachter Hepatitis A immun sind gegen eine erneute Infektion mit dem gleichen Erreger aus dem MS-1-Serum (sogenannt nach einem Patienten, der beide Hepatitisarten hintereinander durchgemacht hat, wobei der Index "1" den Erreger der Hepatitis A entspricht, während "2" für die Hepatitis B steht). Dagegen sind diese Patienten empfänglich für eine Hepatitis B Infektion aus dem MS-2-Serum, mit anderen Worten: zwischen beiden Hepatitiden besteht keine Kreuzimmunität. Auch hier wurde wieder festgestellt, daß die Serumhepatitis auch oral übertragen werden kann (s.o. 11, 45, 105, 112) wenn auch dieser Übertragungsweg weitaus seltener ist und die Inkubationszeit bei oraler Übertragung länger dauert. Umgekehrt kann die Hepatitis A auch parenteral übertragen werden (116).
Wenn KRUGMAN seine Versuche auch gemäß dem World Medical Association's Draft Code of Ethics on Human Experimentation (184) durchführt und wenn man weiter berücksichtigt, daß die Hepatitis in Willow Brook endemisch (88, 89, 176) war, so sind diese Versuche doch kritisch zu würdigen.(162). Andererseits muß man berücksichtigen, daß mit diesen Übertragungsversuchen mit klinischen, epidemiologischen und immunologischen Methoden der Beweis für zwei verschiedene Erregertypen erbracht wurde vor der eigentlichen Entdeckung des Hepatitis A- und des Hepatitis B-Antigen.
Lange Zeit stand die Hepatitisforschung scheinbar still, weil man das eigentliche infektiöse Agens nicht isolieren konnte und Übertragungsversuche auf Tiere zunächst fehlschlugen.

So ist die Entdeckung des Australia-Antigens, wie es von seinem Entdecker zunächst genannt wurde, denn auch eher ein Zufallsbefund.
Bei genetischen Studien über neue Serum-Lipoprotein-Allotypien mit Seren polytransfundierter Patienten wurde das HB_sAg von BLUMBERG erstmals im Serum eines australischen Ureinwohners (daher der Name) nachgewiesen (5, 19-23).
BLUMBERG et al. glaubten zunächst, ein neues Antigen in Leukämieseren entdeckt zu haben (22), weil Patienten mit akuter und chronischer Leukämie dieses Antigen bevorzugt besaßen. Jedoch wurde dann auch bei anderen Erkrankungen ein gehäuftes Auftreten dieses Antigens festgestellt: Hepatitis, Mongolismus (23, 164, 14) und Lepra (24).
Weiter wurde festgestellt, daß das Antigen in der normalen Bevölkerung der USA und Europas sehr selten vorhanden ist, während man es bei der gesunden Bevölkerung in den Tropen und in Südostasien relativ häufig findet (5, 14, 22).
OKOCHI und MURAKAMI (124) zeigten, daß Australia-Antigen positives Blut entweder eine Australia-Antigen positive Hepatitis oder eine Australia-Antigen-Antikörperproduktion hervorruft und bewiesen damit die Assoziation des Australia-Antigens mit der akuten Virushepatitis.
BLUMBERG (25, 26), LONDON (100), HIRSCHMAN (72) und andere (57) glaubten zunächst, das Antigen sowohl bei der Serum- wie auch bei der infektiösen Hepatitis nachweisen zu können, während PRINCE (134) dies bestritt. Er bewies (135) 1968 die Identität des Hepatitis B Antigens mit dem von BLUMBERG gefundenen Australia-Antigen.
1969 konnten GILES et al. (56) nachweisen, daß das MS-2-Agens von KRUGMAN mit dem B Antigen identisch ist.
Diese Identifikation des Hepatitis B Antigens bedeutete, daß die bisherigen Kriterien einer Differentialdiagnose beider Hepatitiden ihre alleinige Bedeutung verloren. Man mußte sich nicht mehr auf klinische Kriterien wie Inkubationszeit

und Infektionsweg beziehen. Allerdings schließt ein fehlender HB-Antigen-Nachweis die Diagnose einer Serumhepatitis nicht aus, da einerseits unsere heutigen Methoden möglicherweise noch zu wenig empfindlich sind und andererseits der Nachweis auch vom Zeitpunkt der Blutentnahme abhängt (63, 89, 90).

Mit der Zunahme des Wissens über das Australia-Antigen ändert sich auch die Nomenklatur. Zunächst wird es Hepatitis - assoziiertes Antigen (HAA) genannt, bis es 1972 auf Vorschlag des Committee on Viral Hepatitis of the National Research Council der USA zu Hepatitis B Antigen (HB Ag) (117) wird. Der Antikörper wird HB Ab genannt.
Nach den Untersuchungsergebnissen von DANE et al. (37) und anderen wird die Nomenklatur von der National Academy of Sciences (118) wie folgt angegeben:

1. Der Begriff HB_sAg (Hepatitis B-surface-antigen) steht für das Hepatitis B Antigen, das an der Oberfläche des DANE Partikel und auf den 20 nm Partikeln gefunden wird, (siehe auch Kapitel III)

2. HB_cAg (Hepatitis B-core-antigen) beschreibt das Antigen des Kerns des DANE Partikel

3. Die gruppenspezifische Determinante a und die Subtypendeterminanten d oder y und w oder r gehören zu dem HB_sAg.

4. Anti-HB_s beziehungsweise anti-HB_c sind die zu 1. bzw. 2. gehörenden Antikörper.

Während die Forschung auf dem Gebiet der Hepatitis B in den letzten 15 Jahren ungewöhnlich stark zunahm, fehlen derartige Erfolge bei der Untersuchung der Hepatitis A, was sich u. U.

durch die immense Bedeutung der Hepatitis B erklären läßt. (siehe auch Kapitel II dieser Arbeit)
TAYLOR et al. (167) verneinen, daß das sogenannte Milan-Antigen (39) oder epidemic hepatitis associated antigen (EHAA) spezifisch für die Hepatitis A ist.
1970 wurde ein Antigen aus den Faeces von Patienten mit Hepatitis A isoliert, daß bis jetzt am ehesten dem Hepatitis A -Virus entspricht.(41, 182).
In jüngster Zeit wurden auch auf dem Gebiet der Hep. A-Forschung weitere Erfolge erzielt. So scheint es, daß das Hep. A-Virus am ehesten ein Enterovirus ist mit einer Größe von 27 nm und einer Dichte von 1,34 g/cm^3 (48).

2. Die Bedeutung des HB_sAg Nachweises

Die Bedeutung der Hepatitisforschung und damit die Suche nach dem auslösenden Agens nahm in den vierziger Jahren durch das gehäufte Auftreten der Serumhepatitis nach Impfungen mit infizierten Seren im zweiten Weltkrieg zu. Äußerer Ausdruck dafür ist das rapide Anwachsen der wissenschaftlichen Literatur über dieses Thema.

2.1. Impfstoffentwicklung

Durch die Entdeckung des Erregers durch BLUMBERG (21) war die Möglichkeit gegeben, diesen genau zu erforschen, um damit dem Ziele einer Bekämpfung jeder Infektionskrankheit, nämlich der Entwicklung eines Impfstoffes, näherzukommen.

2.2. Diagnostik der Hepatitis

Ein Hepatitis B Antigen Befnnd im Serum eines Patienten ist ein sicheres diagnostisches Unterscheidungsmerkman zwischen Hepatitis A und Hepatitis B, wenn der Patient vorher HB_sAg negativ war. Ein negativer Befund schließt jedoch eine Serumhepatitis aus später zu erörternden Gründen nicht aus. Diese Unterscheidungsmöglichkeit ist individualmedizinisch von Bedeutung, denn insgesamt wird die Prognose einer Hepatitis B ernster beurteilt. Bei einer Hepatitis B kommt es im akuten Stadium häufiger zu einer fulminanten Verlaufsform mit meist tödlichem Ausgang (30, 63).
Der Übergang von einer akuten Hepatitis in eine chronische Verlaufsform wird häufig von einem HB_sAg positiven Serumbefund begleitet. Die Literaturangaben über den Prozentsatz von HB_sAg positiven chronischen Hepatitiden sind unterschiedlich, sie schwanken zwischen 3 und 60 Prozent (40, 122, 136, 145, 185, 186).

Die Prognose einer chronisch persistierenden Hepatitis (nach der Klassifizierung von De GROOT (38)) ist im allgemeinen relativ gut (15), REINICKE (145) z. Bsp. untersuchte Blutspender, die chronische HB_sAg Träger waren und fand bei 41 % eine chronischpersistierende Hepatitis.
Die Häufigkeit eines HB_sAg Nachweises beider chronisch aggressiven Hepatitis ist unterschiedlich und schwankt je nach Land zwischen 3 % (33) und 51 % (17), in den USA sind es zwischen 10 bis 15 % (185), in Groß-Britannien (159) 8 %.
Der Verlauf einer HB_sAg positiven chronisch aggressiven Hepatitis scheint protrahierter zu sein als der einer HB_sAg negativen (17, 122).
Was die Prophylaxe einer Infektion anbetrifft, so scheint inzwischen sicher zu sein, daß eine solche mit normalem Gammaglobulin nur bei einer Hepatitis A Exposition sinnvoll ist (109, 115, 183).

2.3. Seuchenhygiene

Von Anfang an, besonders noch vor der Entdeckung des Erregers, standen epidemiologische Fragen bei der Bekämpfung der Hepatitis im Vordergrund, um Infektionsquellen und -ketten aufzuspüren. Mit dem Nachweis des Erregers war erstmals die Möglichkeit,gegeben, die Infektionsquellenforschung objektivierbar zu betreiben (178).
Wegen ihres hauptsächlichen parenteralen Übertragungsweges ist die Hepatitis B im medizinischen Bereich stark verbreitet. Mc AULEY (104) zeigte, daß im Gesundheitswesen Beschäftigte häufiger an Hepatitis erkrankten als Personen, die keinen Kontakt zu Blut- oder Blutprodukten hatten.
Umgekehrt kommt das medizinische Personal, wenn es sich um chronische Träger handelt, wieder als Infektionsquelle in Betracht, wie GARIBALDI et al. bei einem Epidemieausbruch einer im Krankenhaus erworbenen Serumhepatitis zeigte (49). Er konnte nachweisen, daß 11 Patienten eines 300 Betten-Krankenhauses durch eine HB_sAg positive Krankenschwester infiziert

wurden.
Hier tauchen besondere forensische Probleme auf. Für die akute Phase der Erkrankung bis zur Genesung, d. h. normale Transaminasen und Bilirubinwerte und bei der Hepatitis B ein negativer HB_sAg Befund, für diese Phase also ist sicher für die meisten Berufe Isolierung und Berufsverbot sinnvoll (178).

Auch bei der Hepatitis B sollte trotz des überwiegend parenteralen Infektionsweges in der akuten Phase eine Isolierung und entsprechende Desinfektionsmaßnahmen vorgenommen werden, da das Antigen in letzter Zeit auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten außer dem Blut nachgewiesen wurde (Galle, Magensaft, Gelenkflüssigkeit, Speichel, Stuhl, Urin und Menstrualblut (9, 18, 169). Entsprechende Desinfektionsmaßnahmen sollten auch für die chronischen Hepatitiden vorgenommen werden (insbesondere HB_sAg positive chronisch persistierende und chronisch aggressive Form), da hier davon ausgegangen werden muß, daß der Prozeß durch die Erreger selbst in Gang gehalten wird und die Erreger durch Stuhl und Urin ausgeschieden werden können (144).
Ob in diesen Fällen ein Berufsverbot auszusprechen ist, läßt sich nach WEISE (178) derzeit noch nicht eindeutig beantworten. Für diese Fälle, also gesunde HB_sAg Träger und HB_sAg Persistenz nach einer Hepatitis, schlägt WEISE häufige serologische Kontrollen vor.

2.4. Hämodialyse

Seit 1965 wird in zunehmendem Maße über Hepatitiden in Dialysezentren berichtet (68, 99, 170). So berichteten bei einer 1967/68 durchgeführten Untersuchung 41 % der Dialysezentren in den USA über einzelne Hepatitisfälle (69).
Eine spätere Untersuchung von GARIBALDI (50) zeigt schon in 53 von 65 Dialysezentren das Auftreten von Hepatitis B.
1971 werden in Europa von 43 % der Dialysezentren Hepatitiden gemeldet (128).

In zunehmendem Maße wird über einzelne Epidemien in den Nierenzentren berichtet. BRIGGS (28) z. B. teilt eine Epidemie mit, bei der 18 % der Patienten und 10 % des Personals betroffen war.
So ist auch zu verstehen, daß das HB_sAg in vielen Zentren fast schon endemisch wurde. FOREST et al. (44) untersuchten 108 Dialysezentren in den USA und fanden eine Durchseuchungsrate von 5,2 % bei den Patienten und von 2,5 % beim Personal.
In der Schweiz fand WEBER (177) bei 14 % der Dialysepatienten das HB_sAg, während RENGER (147) für die DDR einen Prozentsatz von 11,7 % angibt.
SZMUNESS (165) untersuchte 583 Patienten und 451 Angestellte in 15 Hämodialysezentren und fand das HB_sAg bei 16,8 % der Patienten und 2,4 % des medinischen Personals.
Wenn man bedenkt, daß 7 % der Patienten und 1 % des medizinischen Personals an der Hepatitis B sterben (128) nnd daß allein in den USA 1972 ca. 7 500 Patienten dialysebehandelt wurden (119), wird die Tragweite des Problems bewußt.
Um diese neue epidemiologische Situation zu beherrschen, sind sicher extrem sauberes Arbeiten und häufige Kontrollen auf HB_sAg nötig, um die Infektionsquellen auszuschließen (28). Nur so kann man vermeiden, daß die Dialysezentren zu einer dauernden Infektionsquelle werden.

2.5. Die Posttransfusionshepatitis

Die größte Infektionsquelle des HB_sAg stellt heute jedoch transfundiertes Blut oder Blutprodukte dar. Man schätzt, daß allein in den USA pro Jahr mehr als 30 000 Hepatitisfälle mit 1 500 - 3 000 Todesfällen durch transfundiertes Blut verursacht werden. Rechnet man die subklinischen Verläufe hinzu, wird die Zahl auf 150 000 geschätzt (107).

Die Übertragung einer Virushepatitis ist damit die häufigste Komplikation nach Transfusion von Blut und Blutprodukten (77, 107).
Nach K. H. MEYER zum BÜSCHENFELDE (109) wird das Auftreten und die Häufigkeit einer Virushepatitis nach Übertragung von Blut und Blutprodukten von folgenden Faktoren beeinflußt:

1. Von der Frequenz infektiöser Blutspender
2. Vom Titer infektiösen Materials im Spenderblut
3. Von der individuellen Hepatitis Empfänglichkeit der Empfänger von Blut- und Blutprodukten

In Nordamerika und Europa ist mit 0,1 - 1 % antigenpositiven Personen zu rechnen, die meist zufällig bei Routineuntersuchungen in den Blutspendezentralen entdeckt werden (23). Dagegen findet man in Afrika und Asien in bestimmten Gegenden bis zu 16 % (72).

Der kausale Zusammenhang zwischen der Transfusion HB_sAg positiven Blutes und dem Auftreten einer Transfusionshepatitis wurde inzwischen mehrfach bestätigt.
So wies PRINCE (134) 1968 das HB_sAg im Serum einer klassischen Transfusionshepatitis nach.
1969 vermutet GOCKE (58), daß nach Transfusion von HB_sAg positivem Blut 75 % der Empfänger mit einer Hepatitis und/oder einer Immunantwort reagieren. 1970 belegt er diese Zahlen durch weitere Untersuchungen (59). Mit der Immunodiffusion nach OUCHTERLONY weist er nach, daß 31 von 42 Empfängern von HB_sAg positivem Blut (das sind 74 %) mit einer Hepatitis und/oder der Bildung von Antikörpern reagieren.
1972 werden diese Zahlen mit der empfindlicheren Überwanderungselektrophorese untermauert (61): 52 % der Empfänger HB_sAg positiven Blutes reagierten mit einer Hepatitis oder einer HB_sAg-ämie, weiter 23 % bildeten Antikörper.

KORETZ et al. (86) bewiesen den Zusammenhang zwischen einer Transfusion von HB_sAg positivem Blut und einer darauffolgenden Virushepatitis ebenfalls eindrucksvoll. Er testete 6 399 Blutkonserven (mit der Immunodiffusionsmethode HB_sAg-negativ) mit empfindlicheren Methoden nach. 2,2 % dieser Konserven waren nach Testung mit der passiven Hämagglutination und dem Radioimmunassay zusätzlich positiv. Von 63 Empfängern dieses HB_sAg positiven Blutes bekamen 24 (= 38 %) eine Hepatitis. 5 weitere Patienten (= 8 %) bildeten Antikörper, während ein anderer Empfänger HB_sAg Träger wurde ohne irgend welche Erkrankungszeichen.

Als erste berichteten OKOCHI et al. (125) über ein statistisch signifikantes Auftreten einer Hepatitis nach Transfusion HB_sAg positiven Blutes.

REINICKE et al. (146) fanden in Dänemark nach Transfusion von 42 000 Einheiten Blut während 2 Jahren 14 Fälle von Transfusionshepatitis.
Für die Bundesrepublik Deutschland berichten unter anderen CREUTZFELDT und BERTHOLD. Bei CREUTZFELDT beträgt die Häufigkeit der Transfusionshepatitis nach Einzeltransfusionen (1 - 3 Konserven) 10,6 %, bei Transfusionen von mehr als drei Blutkonserven 23,4 %, während sich bei Empfängern von mehr als 10 Konserven eine Hepatitishäufigkeit von 28,6 % findet (36). BERTHOLD (16) berichtet über 55 Transfusionen HB_sAg positiven Blutes, die in 6 Fällen von einer Hepatitis gefolgt waren.

Aus den oben dargelegten Zahlen wird deutlich, wie wichtig es für die Blutbanken ist, möglichst alle potentiellen HB_sAg Überträger zu eliminieren. Daher ist es auch verständlich, daß man versucht, immer noch empfindlichere und noch spezi-

fischere Methoden zu entwickeln.
Ob die Lösung des Problems Transfusionshepatitis jedoch allein über den Weg einer größeren Empfindlichkeit und Spezifität führt, ist noch nicht sicher (siehe auch Kapitel 5).

3. Natur und Eigenschaften des HB_sAg

3.1. Morphologie des HBV

BAYER et al. (14) untersuchte 1968 als erster HB_sAg elektronenoptisch. Die Seren stammten von drei Patienten (Leukämie, Retikuloendotheliose, M. Down und Hepatitis).
Nach Reinigung mittels Zentrifugation und Elektrophorese und anschließender Negativfärbung fand BAYER im Elektronenmikroskop Partikel mit einem Durchmesser von 19 - 21nm. Die Oberfläche schien aus knopfähnlichen Untereinheiten von 3 nm Durchmesser zu bestehen. Nach Zugabe von spezifischen Kaninchen-Antikörper konnte BAYER eine Ausfällung der Partikel beobachten.

PRINCE (134) beschrieb etwa zur gleichen Zeit Partikel mit einem Durchmesser von annähernd 25 nm, die nach Morphologie, chem. Zusammensetzung und Dichte zu den Arboviren gehörten.

Eine andere Arbeitsgruppe um HIRSCHMAN (72) bestätigte Bayers Ergebnisse und wies ebenfalls Partikel um 20 nm nach.
Neben den bereits oben beschriebenen sphärischen Partikeln fand ALMEIDA (3) in ihrer immunelektronenmikroskopischen Untersuchung noch tubuläre Formen mit einem Durchmesser von ziemlich genau 20 nm, aber verschiedener Länge, oft bis zu mehreren hundert nm. Auf diesen Formen war eine Periodizität von 3 nm sichtbar. Oft waren die Enden trommelschlegelförmig aufgetrieben. ALMEIDA hielt es für möglich, daß die 20 nm sphärischen Formen aus Untereinheiten bestehen, konnte die Oberfläche jedoch nicht genau ausmachen.
In einer anderen Arbeit, wo sie die Immunantworten des Organismus auf HB_sAg Exposition untersucht, kann sie die oben beschriebenenBefunde bei anderen Patienten bestätigen (2).

1970 erscheint eine wichtige Arbeit von DANE et al. (37). Diese Arbeitsgruppe beschreibt eine dritte Partikelsorte, die offenbar nur in einigen HB_sAg positiven Seren vorkommen. Diese sogenannten DANE-Partikel haben einen Durchmesser von 42 nm und bestehen aus einem inneren Kern von 28 nm Durchmesser mit einer Schale von 2 nm und einer äußeren Hülle von 7 nm Dicke. DANE vermutet, daß die 42 nm Formen das Hepatitis B Virus sind, während die 22 nm Partikel und die tubulären Formen nicht infektiöses, überschüssiges Hüllenmaterial darstellen.
Auch andere Autoren weisen die 42 nm Formen nach, so z. B. KROHN (87) bei Patienten mit primärer biliärer Cirrhose unbekannter Genese.
COSSART Et al. (35) widersprechen der Vermutung von DANE, daß die großen Partikel das Virus darstellen. Diese Autoren meinen, daß die Kombination von zwei oder mehreren morphologischen Einheiten erst das eigentlich infektiöse Agens ergibt.

ALMEIDA et al. (4) untersuchten die DANE-Partikel genauer. Nach Behandlung mit dem Detergens Twen 80 teilten sich die 42 nm Partikel in eine äußere Hülle und eine innere sphärische Komponente von 27 nm Durchmesser, die einem Rhinovirus ähnelt. Antikörper eines Patienten mit durchgemachter Hepatitis reagierte nur mit der inneren Komponente, jedoch nicht mit der äußeren Hülle und den 20 nm Formen. Es bildeten sich Immunkomplexe, die denen ähnelten, die man in der Leber von Patienten fand, die an einer Serumhepatitis starben.

Die oben beschriebenen Befunde haben zu einer klareren Definition des Hepatitis B virus geführt, wie sie schon in Kapitel 1 dargelegt wurde (118).

3.2. Immunologische Differenzierung des HB_sAg

Mit Hilfe der Immunoduiffionsmethode lassen sich anhand von Spornbildungen mehrere Subtypen des HB_sAg differenzieren. Neben einer allen Antigenen gemeinsamen gruppenspezifischen Determinante "a" besitzt das HB_sAg auf demselben Partikel weitgehend alternativ die Subtypendeterminanten "d" oder "y". (96) Die außerdem von Le BOUVIER beschriebene Determinante x scheint weitgehend wirtsspezifisch zu sein (74).

BANCROFT et al. (13) beschrieben weitere Antigendeterminanten, die mit Hilfe von Kaninchenseren entdeckt wurden. Somit können die Subtypen des HB_sAg unterteilt werden in "adw" und "adr" beziehungsweise "ayw" und "ayr".
Über die Bedeutung der Befunde herrschen unterschiedliche M einungen. Während HOLLAND et al. (74) den Subtyp "ad" häufiger bei Patienten mit chronischer Hepatitis und bei Blutspendern fand, sieht GORDON (64) keine Korelation diese Subtyps mit einer bestimmten Hepatitisform.
Schließlich entdeckten MAGNIUS und ESPMARK (106) eine neue Determinante "e" im Serum eines Patienten mit akuter Hepatitis, indem sie Antikörper von HB_sAg positiven Normalpersonen verwandten. Diese Determinante ist sicher nicht auf dem HB_sAg Partikel lokalisiert.

3.3. Physikalische Eigenschaften

3.3.1. Einleitung

Um Aussagen über die physikalischen Eigenschaften treffen zu können, ist es wichtig, das HB_sAg möglichst rein untersuchen zu können.
Einmal muß das HB_sAg von den übrigen Serumbestandteilen getrennt werden, zum anderen ist die Auftrennung in die verschiedenen Formen des HB_sAg sinnvoll, um die Eigenschaften

der einzelnen Formen bestimmen zu können. Die Trennung kann mit der Immunelektronenmikroskopie erfolgen, (s. später) gebräuchlicher sind aber physikalische Methoden.

Das Prinzip der physikalischen Reinigung und Isolierung des HBV besteht in einer mehrstufigen Zentrifugation in verschiedenen Medien, hautsächlich CsCl, Saccharose und Kaliumtartrat (10, 51, 52, 83, 108, 172). Fast die gesamte Literatur beschränkt sich bei der Untersuchung der physikalischen Eigenschaften auf die 20 nm Partikel, da die Isolierung und Anreicherung der filamentösen Formen und der Dane-Partikel noch Schwierigkeiten bereitet.

3.3.2. Molekulargewicht.

Schon bevor die Partikelnatur des HB_sAg bekannt war, wurde ein hohes Molekulargewicht vermutet.
ALTER (5) isolierte das Antigen in der ersten Säule von einer Gel-Chromatographiereihe und schloß daraus, daß es ein hohes Molekulargewicht hat.
PORTOCALA (133) fand 1972 ein Molekulargewicht ähnlich Makroglobulinen und ß-Lipoproteinen zwischen $3 - 4 \times 10^6$ und $20 - 30 \times 10^6$.
Aus Sedimentationskonstante und Diffusionskoeffizent wurde von KIM (83) ein Molekulargewicht von $2{,}4 \times 10^6$ errechnet.
GERLICH gibt ein MG von $2{,}5 \times 10^6$ an (53).

3.3.3. Sedimentationskonstante

Die Sedimentationskonstante wird in der Literatur unterschiedlich angegeben.
GERIN (51) findet nach Zentrifugation in einem 5 - 20 % Sacchorose Gradienten mit Adeno-associiertem Virus als internem Marker eine Sedimentationskonstante von 110 an.

1971 errechnet er eine Sedimentationskonstante von 54 S (52).
Der gleiche Autor untersucht 1972 ein hochgereinigtes HB_sAg Präparat, das nur 20 nm Formen enthält und findet eine Sedimentationskonstante von 86 S (52).
SCHOBER gibt einen Wert von 34 S an (154). BOND (93) findet bei experimenteller Untersuchung einen Wert von 43,6 S bei Berechnung findet er 43,5 S.
Genaue Untersuchungen zu Bestimmung dieser Größe finden sich auch bei KIM (83). Bei gereinigtem HB_sAg bestimmt er (83) die Sedimentationskonstante in Verdünnungen. Nach Extrapolatin zur Nullkonzentration und Korrektur zu Standardbedingungen findet er einen Wert von 40,2 S. Zur Berechnung gibt er folgende Formel an:

$$st = \left[\frac{10^{13} \times 1 \text{ u } (rb/r)}{4\pi^2 (rpm)^2_{max}}\right] \left[\frac{(rpm)^2_{max}}{(rpm)^2}\right]$$

s = beobachtete Sedimentationsrate,
t = Zeit in Stunden
rb= Abstand des Meniscus von der Rotationsachse
r = Abstand der obersten, HB_sAg haltigen Fraktion von der Rotationsachse zur Zeit t.

Die großen Unterschiede der angegebenen Werte zwischen GERIN und den anderen lassen sich wahrscheinlich darauf zurückführen, daß gereinigtes HB_sAg unter bestimmten experimentellen Bedingungen aggregiert und damit bei der Bestimmung der Sedimentationskonstante falsch hohe Werte gibt (52).

3.3.4. Diffusionskoeffizient

Le BOUVIER gibt einen Diffusionskoeffizient von ca. $2 \times 10^{-7} cm^2/sec$ an (94). Die Gleichung zur Berechnung lautet:

$$x_b^2 / x_g^2 = D_b / D_g$$

wobei $x_g = 0,4$ ein Experimentalwert ist, der bei der Immunodiffusion bei äquivalenter Position der Antigen-Antikörper-Präzipitate gefunden wird.
D_b = Diffusionskoeffizient für den Antikörper, $4,81 \times 10^{-7} cm^2/sec$
$x_b = 1 - x_g$

KIM (83) bestimmt mittels einer Ultrazentrifuge bei 6 000 Umdrehungen pro Minute und 20 °C Temperatur einen Diffusionskoeffizienten von $2,278 \times 10^{-7}$ cm^2/sec.

3.3.5. Dichte

ALTER und BLUMBERG (5) geben 1966 eine Schwebedichte von 1.063 - 1,30 g/cm^3 in Kaliumbromid an. Damit unterscheidet sich das HB_sAg von den low-density-ß-Lipoproteinen mit einer Dichte von weniger als 1.063 g/cm^3 und den anderen Serumproteinen mit Ausnahme des high-density ∝-Lipoproteins, die alle eine Dichte von mehr als 1,30 g/cm^3 haben.

Aus diesen Werten schlossen ALTER und BLUMBERG, daß das HB_sAg einen Lipidteil enthalten muß. Die Streuung der Werte erklärten sie mit den verschiedenen Graden der Delipidation durch die Vorbehandlung.
Eine andere Erklärung für die Streuung der Werte sieht GERLICH (54) darin, daß HB_sAg eine Mischung aus leeren und nuklein-

säurehaltigen Partikeln sein könnte. Daneben schließt GERLICH nicht aus, daß HB_sAg mit verschiedenen dichteren Serumproteinen Komplexe bilden kann, die stufenweise abdissozieren. Diese Proteine könnten ein Stabilisierungseffekt haben, da reines HB_sAg rasch seinen Antigentiter verliert (111). GERIN (51) gibt 1969 eine Dichte von 1,20 g/cm^3 in CsCl, 1,16 g/cm^3 in Saccharose und 1,15 g/cm^3 in Kaliumtartrat an. Nach Behandlung des HB_sAg mit 1 % Natrium-Desoxycholat (DOC) wurde eine Dichte von 1,23 g/cm^3 in CsCl festgestellt, ohne daß sich dieStruktur des HB_sAg oder die Reaktionsfähigkeit der Komplementbindungsreaktion änderte. Durch Detergentienbehandlung ändert sich der Lipidanteil des HB_sAg. Nach Vorbehandlung mit TWEN 80, einem Detergens, oder nach Frieren und Auftauen wurde ein Aktivitätsgipfel bei einer Dichte von 1,18 g/cm^3 und ein weiterer bei 1,39 g/cm^3 gefunden. GERIN vermutete,daß die high density Komponente nur aus Proteinen und Nukleinsäuren bestehen.

BARKER (10) findet eine Dichte von 1,22 - 1,27 in CsCl. Nach Lipidextraktion erhöht sich auch hier die Dichte auf 1,28 g/cm^3, was nach Meinung BARKERS zwar immer noch zu wenig für einen kompletten Virus ist, aber der Dichte von sogenannten kernlosen Viruspartikeln entspricht.

VYAS (172) erhält bei seinen Untersuchungen eine Dichte von 1,17 - 1,25 g/cm^3 in einem CsCl-Gragienten. KIM (83) untersuchte die Dichte in Saccharose und gibt einen Wert von 1,170 g/cm^3 an, während GERLICH (54) im gleichen Medium eine Dichte von 1,21 g/cm^3 findet.

KIM meint, daß sich die Dichte nach Detergentienbehandlung nicht ändert. Er wies nach, daß eine solche Behandlung kein Herauslösen von Phospholipiden bewirkt. Die von anderen Autoren gefundene Änderung der Dichte nach Detergentienbehandlung erklärt KIM mit einer Aggregation der Partikel nach einer solchen Behandlung.

3.3.6. Elektrophoretische Beweglichkeit

Die Literaturangaben über die elektrophoretische Beweglichkeit sind unterschiedlich.
ALTER (5) gibt eine elektrophoretische Beweglichkeit im Bereich der α_1 -Globuline an, dagegen beschreibt PORTOCALA (133), daß das HB_sAg mit den α_2 -Globulinen wandert.
1971 wird das Altersche Ergebnis von JOWZIAK (80) bestätigt.

KIM stellt 1973 fest, daß HB_sAg meist in der Zwischen α_2 ß - Zone wandert; bei einigen Patienten wandert es primär im ß-Globulinbereich, tendiert aber in die α_2 ß-Zwischenregion. Bei seinen Untersuchungen sind die Ergebnisse zwischen gereinigtem und ungereinigtem HB_sAg identisch.
Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit erklärt KIM mit verschiedenen Subtypen, so soll die ß-Motilität mit der Subtypenvariante d korrelieren.

3.3.7. Absorptionsspektrum und Extinktionskoeffizient

GERIN (51) gibt 1969 ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, also im UV-Bereich an.
VYAS (172) bestimmt bei gereinigtem und konzentriertem Präparat eine optische Dichte von 9,2 bei 280 nm. Er berechnet für das Protein im HB_sAg einen Extinktionskoeffizienten von $E^{0,1\%}_{1cm} = 3,726$.
GERLICH (54) findet bei 283 nm eine hochspezifische Extinktion von 6,9 für eine 0,1 % Lösung. Dieser Wert ist etwa zehnmal so hoch wie bei durchschnittlichen Proteinen und entspricht einem Tryptophangehalt von 25 %.
Das Extinktionsverhältnis E (260/280 nm) ergibt nach GERLICH keinen sicheren Anhaltspunkt, ob HB_sAg Nukleinsäuren enthält oder nicht, da die große Tryptophanmenge einen Nukleinsäureanteil von weniger als 10 % im Spektrum überdecken würde.
GERIN (52) argumentiert im Prinzip gleich.

3.3.8. Beständigkeit gegen Hitze und Kälte

HB_sAg ist gegenüber Temperaturschwankungen in weiten Bereichen stabil. SHULMAN et al. (161) arbeiteten z. T. mit Seren, die über 20 Jahre bei - 20°C gelagert wurden und deren Antigenität und Infektiösität erhalten war. Auch ein Erhitzen auf 50 °C über 12 Stunden zerstört nicht die Reaktionsfähigkeit in den Untersuchungen (10, 51, 111).
KRUGMAN et al. (11) haben berichtet, daß vorsichtiges Erhitzen auf 98 °C für 1 Minute zwar die Infektiosität, nicht aber die Antigenität zerstört, was sicher eine wichtige Erkenntnis auf dem Weg zur Entwicklung eines Impfstoffes ist.

3.4. Chemische Eigenschaften

3.4.1. Zusammensetzung nach den färberischen Eigenschaften

Eine Möglichkeit, die Zusammensetzung eines Stoffes zu untersuchen, ist die Bestimmung der färberischen Eigenschaften. ALTER und BLUMBERG (5) stellten 1966 eine gute Anfärbbarkeit mit dem Proteinfarbstoff Azokarmin und eine weniger starke Anfärbbarkeit mit dem Lipidfarbstoff Sudanschwarz fest.
KIM (83) wies zusätzlich bei gereinigtem HB_sAg einen Kohlehydratanteil mit der PAS-Färbung nach. Nach Äthervorbehandlung war die Fettfärbbarkeit erhalten, während Chloroform-Methanol- vorbehandeltes HB_sAg sich weniger deutlich mit Sudanschwarz anfärbte.
JOKELAINEN (79) konnte 1970 den Kern des Dane-Partikel mit Uranyl-Acetat anfärben, ein Beweis für das Vorhandensein von Nukleinsäuren. Die anfangs negativen Ergebnisse anderer Autoren bezüglich der Anfärbbarkeit mit Uranylacetat sind wohl damit zu erklären, daß sie mit Seren arbeiteten, die keine oder nur wenige Dane-Partikel enthielten.

3.4.2. Proteingehalt

VYAS et al. (172) bestimmte den Proteingehalt mit der Mikro-Kjeldahl-Methode auf 2,469 mg/ml.
JOWZIAK (80) erhält mit der Biuret-Methode einen Wert von 10,64 mg/ml bei gereinigtem HB_sAg. Den Gesamtproteingehalt gibt er mit 70 % an, bestimmt nach der Methode von Ellmann. Nach Lipidextraktion mittels eines Chloroform-Methanol-Gemisches kommt er auf einen Lipidanteil von 25 %.

3.4.3. Polypeptidketten

Zur Analyse der Polypeptidketten behandelte GERIN (52) ein gereinigtes und konzentriertes HB_sAg Präparat mit Natrium-Dodecylsulfat, Harnstoff und 2-Mercaptoäthanol. Sowohl bei der ad- als auch bei der ay-Variante des HB_sAgfand er im Prinzip die gleichen Polypeptidketten, nämlich zwei große Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 26 000 und 32 000 und vier kleinere Peptiduntereinheiten mit einem Molekulargewicht von 40 000 bis 95 000. Die beiden Subtypen unterscheiden sich nur durch die unterschiedliche Verteilung der einzelnen Polypeptidketten.
Bei dem ay-Subtyp wurde noch zusätzlich eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 65 000 entdeckt. In der zitierten Arbeit wurden hauptsächlich die 20 nm sphärischen Formen untersucht. Dane-Partikel waren in dem Untersuchungs - material nicht vorhanden.
VYAS (172) findet bei seinen Untersuchungen 1972 ebenfalls zwei Polypeptide mit einem MG von 25 000 bzw. 35 000, die kleineren, von GERIN gefundenen Peptide kann er nicht nachweisen.
GERLICH (54) konnte mindestens sechs Komponenten mit verschiedenem Molekulargewicht erkennen, darunter zwei große Ketten mit einem MG von 24 200 bzw. 27 800, sowie eine kleinere mit einem MG von 34 000. Daneben konnte er von Probe zu Probe in wechselnder Verteilung und Intensität schwächere, zum Teil diffuse Banden in der Elektrophorese erkennen, die einem MG

von 50 000, 70 000 und 90 000 entsprachen.

3.4.4. Aminosäurezusammensetzung

GERLICH (54) bestimmte wie bereits oben erwähnt mit der Untersuchung des UV-Spektrums einen Tryptophangehalt von 25 %.

VYAS et al. (172) erfaßten bei ihrer Analyse den Tryptophangehalt nicht, da sie vorher eine saure Hydrolyse durchführten, was zu einer Zerstörung des Tryptophans führt. VYAS stellt einen hohen Leucin-,Prolin- und Seringehalt bei wenig Tyroxin fest.

3.4.5. Nukleinsäure

Eine der am brennendst interessierenden Frage war die nach der Nukleinsäure, da so ein Beweis für die Virus - Natur des HB_sAg geführt werden könnte.
Neben der Anfärbbarkeit mit Uranyl-Acetat (Jokelainen) ist der Nachweis der DNA-Polymerase ein indirekter Beweis für das Vorhandensein von Nukleinsäuren, nachdem physikalische Methoden (Extinktion) wegen der oben angeführten Gründe nicht ergiebig sind.
Auch hier waren anfangs neben positiven Ergebnissen negative Befunde zu verzeichnen. GERIN et al. (52) und LOEB et al. (98) konnten keine DNA-Polymerase nachweisen, weil sie mit Seren arbeiteten, die keine Dane-Partikel enthielten und dieses Enzym im Kern der Dane-Partikel lokalisiert ist (65, 82, 148).
HIRSCHMAN (73) konnte 1971 als erster eine schwache endogene DNA-Synthese als Beweis für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase anführen. Eine RNA-Synthese konnte er nicht feststellen.

Die erste direkte Bestimmung von RNA stammt von JOWZIAK (80).

Er bestimmte aus 3 - 5 mg HB_sAg spezifischen Materials 150 - 250 ng einer 9 S RNA nach der Methode von Mejbaum. Bei der Reinigung des HB_sAg ging er in einer völlig anderen Weise als die meisten anderen Autoren (z. B. GERIN 52) vor, er verzichtete z. B. ganz auf Ultrazentrifugation in CsCl.
Insgesamt bestimmte er einen RNA-Gehalt von 5 %, wobei sich die Nukleotide in folgendem Verhältnis fanden:

Uridin:Guanosin:Cytidin:Adenosin = 1,3:1,0:1,2:1,1

DNA konnte er mit kolorimetrischen Methoden nicht nachweisen. Es ist fraglich, ob die von JOWZIAK gefundenen Ergebnisse mit anderen Methoden reproduzierbar sind.

KRUGMAN stellte 1974 fest, daß der DNA-Polymerasenachweis (92) ebenso wie der Nachweis des Antikörpers gegen den Kern des Dane-Partikel (78) ein Maß für die Virusreproduktion im Organismus ist. Die Bedeutung dieser Befunde liegt einmal in der prognostischen Beurteilung einer Hepatitis (so ist die DNA-Polymerase besonders lange bei chronischen HB_sAg-Trägern nachweisbar) und zum anderen in der Möglichkeit, damit zukünftige Hepatitisimpfstoffe auf ihre Sicherheit und Effektivität zu überprüfen.

Nachdem man aus den DNA-Polymerase-Aktivitäten einen Hinweis auf das Vorhandensein von Nukleinsäuren hatte, wurde das Reaktionsprodukt dieses Enzyms, die DNA untersucht. ROBINSON (148) fand, daß die DNA mit dem Kern des Dane-Partikel assoziiert ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben cirkuläre, aus zwei Fibrillen bestehende DNA-Moleküle mit ca. 0,78 μ_m Länge. Ohne vorherige DNase Behandlung wurden zusätzlich gerade Moleküle zwischen 0,5 und 12 μm Länge gefunden.

Mit verschiedenen Methoden (UV-Absorption, Hitzedenaturierung) bestimmten ROBINSON et al. den Gehalt an Guanosin und Cytosin auf 48 - 49 %. ROBINSON glaubt, daß die Dane-Partikel zu keiner bekannten Virusart gehören. Die von ihm gefundene DNA wäre zu klein, um die 7 S Polypeptidkette von GERIN zu kodieren. Für ROBINSON bedeutet dies, daß entweder die von ihm gefundene DNA von defekten Virusformen stammen und daß Partikel mit größeren DNA-Molekülen vorhanden sein müssen, die aber wegen ihrer geringen Zahl nicht entdeckt werden können, oder daß aber andererseits die Dane-Partikel zu ihrer Vermehrung einen zweiten Virus benötigen.

4. Nachweismethoden des HB_sAg

Die zur Zeit gebräuchlichen Nachweismethoden des HB_sAg sind entweder serologische, die weitgehend auf der Antigen-Antikörperproduktion beruhen, oder elektronenoptische Verfahren wie Negativfärbung oder auch zusätzlich Immunelektronenmikroskopie.

4.1. Elektronenmikroskopie

BAYER, BLUMBERG und WERNER (14) entdeckten 1968 durch elektronenoptische Untersuchungen als erste die Partikel des HB_sAg. Das Prinzip der Negativfärbung besteht darin, daß man das zu untersuchende Material mit einem elektronendichten Medium umgibt.
Neben der Möglichkeit, mit dieser Methode z. B. auch Biopsieproben (Leber) auf das Vorhandensein von HB_sAg zu untersuchen, kann man die Elektronenmikroskopie auch zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Komplexen benützen, die sonst nur sehr schwer zu entdecken sind.
ALMEIDA (2) konnte so feststellen, daß die Schwere einer Hepatitis von der Balance zwischen Antigen und Antikörper abhängt: ein symptomfreier HB_sAg-Träger hatte nur Antigen, aber keinen Antikörper im Serum, ein anderer Patient mit chronisch aktiver Hepatitis hatte neben freien HB_sAg Partikeln vor allem Immunkomplexe im Serum und bei einem dritten Fall, einem Patienten mit einer fulminaten Hepatitis wurde ein Antikörperüberschuß gefunden.
Wenn das zu untersuchende Serum einen sehr niedrigen Antigengehalt hat oder wenn verschiedene morphologische Formen vorliegen, kann man sich zusätzlich der Immunelektronenmikroskopie bedienen, d. h. der Zugabe eines spezifischen Antiserums unter dem Mikroskop. Damit kann man die immunologischen Phänomene direkt studieren. Die Empfindlichkeit der Elektronenmikroskopie gleicht nach einer Untersuchung von COSSART (34) der der Komplementbindungsreaktion. Sie ist auch relativ

schnell durchzuführen, wird aber wegen ihres technischen und personellen Aufwandes den Forschungslaboratorien vorbehalten bleiben, wo sie aber zur morphologischen und immunologischen Untersuchung wertvolle Beiträge liefern kann.

4.2. Immunodiffusion

Die Immunodiffusion nach OUCHTERLONY (127) ist die Methode, mit der HB_sAg erstmals nachgewiesen wurde (5). Sie ist die einfachste, jedoch auch unempfindlichste Methode. (97, 127, 137, 152, 166, 168).
Ein weiterer erheblicher Nachteil ist es, daß es ein bis drei Tage dauert, bis man die Ergebnisse ablesen kann, was natürlich für einen Massenbetrieb wie es eine Blutspendezentrale ist (wo zudem häufig Frischblutkonserven bereitgestellt werden müssen) ungeeignet ist. Hinzu kommt, daß Antigen-Antikörper-Komplexe, wie sie häufig in den ersten Tagen einer Hepatitis auftreten können, oft falsch negative Ergebnisse bedingen, da die Komplexe wegen ihrer Größe nicht ins Gel diffundieren können. Falsch positive Resultate werden andererseits durch unspezifische Präzipitate von Lipoproteinen in der Agarose verursacht.
Die Empfindlichkeit der Methode kann durch verschiedene Kunstgriffe gesteigert werden. Man füllt z. B. während des Testlaufs die Löcher öfters mit Serum nach oder man bringt bekannte positive Seren neben die zu untersuchenden (Reinforcement), Agarose statt Agar verbessert die Empfindlichkeit ebenso.
Wenn die Methode für den Routinebetrieb heute auch ungeeignet ist, so hat sie doch noch ihre Bedeutung zur Subtypisierung des HB_sAg behalten. Dabei besteht das Prinzip der Methode darin, daß die verschiedenen Antikörperspezifitäten auf verschiedenen und meist auch gut trennbaren IgG Molekülen liegen, während die Antigene (z. B. a und d) jeweils gemeinsam auf einem Partikel lokalisiert sind. So kann man durch fortlaufende Präzitationslinien bzw. durch Spornbildung vollkommene bzw.

partielle Identität feststellen (95).

4.3. Komplementbindungsreaktion

SHULMAN und BARKER (160) bzw. PURCELL (143) haben diese Methode als erste zur Bestimmung des HB_sAg angewandt. Wegen des personellen und zeitlichen Aufwandes (von manchen Autoren wird eine Inkubation über Nacht gefordert (137), obwohl laut TAYLOR (166) eine Inkubation von einer Stunde bei 37 °C ausreichend ist), konnte sich der Test nicht in der Routinediagnostik durchsetzen.

Das Prinzip der Reaktion beruht auf der Tatsache, daß bei einer Antigen-Antikörperreaktion Komplement verbraucht wird. Vor Untersuchungsbeginn wird das im Testserum vorhandene Komplement durch Erhitzen auf 56 °C zerstört. Anschließend wird bei der Antigen-Antikörperreaktion wieder Meerschweinchenkomplement zugeführt. Dieser Komplementverbrauch wird nun in einer zweiten, ebenfalls komplementabhängigen Reaktion (Lyse von Hammelerythrocyten) angezeigt.

Nach TAYLOR (166) ist die Empfindlichkeit der Komplementbindungsreaktion 100 - 200 fach größer als die der Immunodiffusion für die Antigenbestimmung und 20 - 40 fach größer für die Antikörperreaktion. PURCELL (143) gibt eine 24 fach größere Empfindlichkeit für das Antigen an.

Durch Austitrieren des Serums ist eine annähernd quantitative Bestimmung des Antigens möglich (168).

Da bei der Komplementbindungsreaktion stets mehrere Verdünnungen des Testserums untersucht werden müssen, ist neben dem größeren Zeitaufwand auch eine größere Antikörpermenge nötig, was natürlich eine starke Kostensteigerung bedeutet. Die Verdünnungsreihe ist notwendig, da hochtitriege Seren wegen des inhibitorischen Effekts des Antigenüberschusses (Prozonenphänomen) falsch negative Resultate ergeben können (152).

Die antikomplementäre Aktivität mancher Seren schränkt die Verwendungsfähigkeit der Komplementbindungsreaktion weiter ein. Unter antikomplementärer Aktivität versteht man die Fixierung von Komplement durch das Serum allein ohne Antikörper oder Antigen. Dadurch kann ein niedriger Antigen- oder Antikörpergehalt verdeckt werden. ALMEIDA (2) konnte nachweisen, daß bei antikomplementärer Aktivität des Serums Antigen-Antikörperkomplexe vorlagen. Nach THAMER haben aber auch HB_sAg negative Seren ikterischer Patienten gelegentlich antikomplementäre Aktivität (168).

4.4. Überwanderungselektrophorese

Diese Methode, die im deutschsprachigen Raum erstmals von PESENDORFER (130) für die HB_sAg-Bestimmung eingesetzt wurde, hat sich wegen ihrer Einfachheit und Schnelligkeit bei relativ guter Empfindlichkeit schnell durchgesetzt.
Das Prinzip der Methode besteht darin, daß das HB_sAg und sein homologer Antikörper eine verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit haben und am Treffpunkt eine Präzipationslinie bilden. Das HB_sAg wandert im elektrischen Feld wie ein α_2-Globulin (5) anodenwärts, während sein Antikörper als IgG-Globulin kathodenwärts wändert.
Neben der gegenüber der Komplementbindungsreaktion wesentlich größeren Einfachheit liegt ein bedeutender Vorteil in der Schnelligkeit. Nach verschiedenen Modifikationen der Pesendorfer'schen Originalmethode (z. B. der in der Tübinger Blutzentrale durchgeführten Methode von SUGG (163) können die Ergebnisse schon nach 30 Minuten abgelesen werden.

Außerdem wird die Empfindlichkeit der Methode gegenüber der Immunodiffusion dadurch gesteigert, daß die Reaktanten in einer Richtung wandern und nicht wie bei der Ouchterlony'schen Me-

thode radial wegdiffundieren, was einen Konzentrationsverlust bedeutet.
Hinzu kommt, daß man in einem Arbeitsgang auf Antigen und Antikörper gleichzeitig untersuchen kann.

Um die beste Methode herauszufinden, variierten viele Autoren die Versuchsbedingungen (113, 114, 163):

1. Plattengröße, Lochgröße, Lochabstand, Stanzmuster
2. Puffer, Zusammensetzung, ph, Ionenstärke
3. Gel: Art, Konzentration, Volumen/Glasplatte, elektroendoosmotische Strömung
4. Stromstärke oder Stromdichte mA/cm^2
5. Feldstärke V/cm zwischen den Filterpapierstreifen
6. Type des Filterpapiers
7. Zeitdauer des Versuchsablaufs
8. Antikörper: Herkunft und Endtiter
9. Kontrollantigen: optimalster Titer

Wenn man eine Methode aufgestellt hat, sollte man die Bedingungen immer wieder überprüfen und vor allem in Publikationen detailliert mitteilen, um die Ergebnisse reproduzierbar zu machen. (Wie SUGG mitteilte, kann etwas so scheinbar unwichtiges wie verschiedenes Filterpapier als Puffer-Gel-Brücke die Ergebnisse eindeutig beeinflussen (163)).
Im Folgenden soll kurz auf die Bedeutung der wichtigsten Parameter eingegangen werden.

4.4.1. Lochgröße, Lochabstand

Fast alle Autoren geben Startlöcher mit einem Durchmesser von 2 - 5 mm und einem Rand-zu-Rand-Abstand von 3 - 6 mm an (6, 29, 60,84, 130).

Das Beste ist es, wenn Lochabstand und Lochgröße aufeinander abgestimmt werden. Wegen des logischen Zusammenhangs zwischen der Zeit bis zum Sichtbarwerden des Präzipitats und dem Abstand der Reaktanten ist es jedoch nicht sinnvoll bei einer Schnellmethode zu große Lochabstände zu wählen.

4.4.2. Puffer

In der Literatur werden kontinuierliche (60, 114, 130) d. h. identische Puffersysteme in Gel und Elektrodenraum und diskontinuierliche Puffersysteme angegeben (6). Meist wird Barbital-Natrium-Acetat-Puffer (130) oder Barbitalpuffer angegeben (60).
Bei der Wahl des Puffers spielt weniger die Zusammensetzung als die Ionenstärke eine Rolle. Eine niedrige Ionenstärke bedingt eine Zunahme der Beweglichkeit der wandernden Teilchen. Als weitere Vorteile einer niedrigen Ionenstärke führt SUGG (163) das Erreichen hoher Feldstärken bei gleichbleibender Spannung und eine geringere Wärmeentwicklung an.

4.4.3. Gel

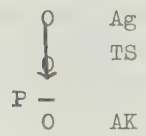
Die Art des Gels und die Konzentration beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit des HB_sAg.
Die meisten Autoren bevorzugen Agarose, da hier die endoosmotische Strömung geringer ist als in Reinagar wegen des niedrigeren Sulfatgruppengehaltes in Agarose (84, 114).
Die Konzentration ist insofern von Bedeutung, als bei hochkonzentriertem Gel die Porengröße abnimmt und damit die Beweglichkeit der Teilchen eingeschränkt wird. Andererseits sind der Konzentrationsminderung durch die Gelierfähigkeit Grenzen gesetzt.

4.4.4. Antikörper

Nach GOCKE (61) ist ein potenter, d. h. hochtitriger Antikörper fast das Wichtigste. Der Nachteil der Agarose bezüglich des Antikörpers (wegen der schwachen endoosmotischen Strömung werden weniger Antikörpermoleküle in Richtung Kathode transportiert als in Agar) muß durch hochtitrige Antikörper ausgeglichen werden, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.

4.4.5. Besonderheiten und Empfindlichkeit der Methode

Einige Besonderheiten sind bei der Überwanderungselektrophorese zu beachten. Der häufigste Artefakt wird durch Trübung des Serums (meist bakterielle Kontamination) verursacht: es entsteht ein Präzipitationsring um das Startloch. Deshalb sollten getrübte Seren vor der Untersuchung durch Zentrifugation gereinigt werden.
Eine andere Fehlermöglichkeit entsteht, wenn man entweder die Elektrophorese zu lange laufen läßt oder wenn man die Reaktionspartner über Nacht inkubieren läßt, um eine vermeintlich bessere Reaktionsfähigkeit zu erreichen. In diesem Fall kann das positive Antigenkontrollserum bei Testung auf Antigen und Antikörper gleichzeitig (in einer drei-Löcher Anordnung) das zentrale Loch überrennen und eine Präzipitationslinie mit dem Antikörper bilden, so daß ein falsch positives Ergebnis entsteht. (siehe untenstehende Schemazeichnung)



Ag = Antigen
TS = Testserum
AK = Antikörper
P = Präzipitationslinie

Einige Autoren färben die Präzipitationslinien vor dem Ablesen. Wenn das für den Routinebetrieb auch zu aufwendig erscheint, so sollten die Platten doch unter definierten Bedingungen abgelesen werden.
In Tübingen geschieht das Ablesen gegen einen schwarzen Hintergrund, wobei die Platte schräg von unten angeleuchtet wird.

Die Empfindlichkeit der Methoden liegt, verglichen mit der Immunodiffusion und der Komplementbindungsreaktion dazwischen. GOCKE (62) gibt folgende Werte an:

	Absolute Empfindlichkeit	Dauer
Agargeldiffusion	1	1 - 2 Tage
Überwanderungselektrophorese	10 - 15	1 - 2 Stunden
Komplementbindungsreaktion	20	1 - 2 Tage

KISSLING kann aber in seiner Studie zeigen, daß man bei der Wahl des geeigneten Antikörpers eine gleich gute Empfindlichkeit wie bei der Komplementbindungsreaktion erreichen kann (84).

4.5. Radioimmunassay

Das Prinzip des Festkörperradioimmunassay sieht folgendermaßen aus: ^{125}J markierter Antikörper wird mit Testserum inkubiert und die im Antigen-Antikörper-Komplex abgebundene Radioaktivität gemessen (1, 175). Die verschiedenen Tests unterscheiden

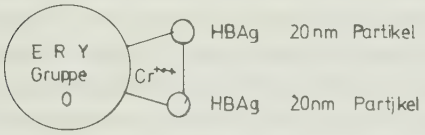
sich hauptsächlich in der Technik des Abtrennens des nicht gebundenen markierten Antikörpers.
Neben der Zeitdauer (bei Ausria II 125 von den Abbott Laboratories sind es mindestens drei Stunden ohne Spezifitätstestung) stehen einer breiteren Anwendung vor allem der technische Aufwand entgegen (man benötigt einen Gammazähler und muß die Erlaubnis haben, mit radioaktivem Material arbeiten zu dürfen).
Anfangs wurde der Test mit reinem Meerschweinchen-Antikörper durchgeführt. Durch manchmal im Testserum vorhandene Antikörper gegen Meerschweinchenserum gab es häufig falsch positive Resultate (141, 158). Das wurde bei der Neueinführung des Ausria II 125 der Abbott-Laboratories geändert, indem man menschliche Antikörper nahm und sie radioaktiv markierte (151).
Die oben genannten Nachteile werden jedoch von der Empfindlichkeit des Testes bei weitem überwogen. PRINCE (141) konnte bei einer Untersuchung von 5 089 Seren von Blutspendern 17 (= 0,30 %) HB_sAg positive Seren ermitteln, während die Überwanderungselektrophorese nur 6 (0,12 %) entdeckte. Setzt man die Empfindlichkeit der Immunodiffusion gleich 1, so liegt die der RIA zwischen 250 und 1 000 fach höher (62). Diese Ergebnisse konnte R. SCHÄUBLE in der Paralleluntersuchung zu dieser Arbeit bestätigen (151).

4.6. Hämagglutinationshemmung und passive Hämagglutination

Auch diese Methode gehörten schon lange zu den immunologischen Forschungsmethoden (32, 70), bevor sie zur Testung des HB_sAg eingesetzt wurden.
Zunächst wurde die Hämagglutinationshemmung von VYAS und SHULMAN (171) eingeführt.

Das Prinzip des Hämagglutinationshemmungstestes besteht im folgenden: Erythrocyten der Blutgruppe O (Rh negativ) werden mittels $CrCl_3$ als Kupplungsreagenz mit hochgereinigtem HB_sAg beladen. Zum Nachweis des Antigens wird zunächst Antikörper zum Testserum gegeben. Ist in diesem HB_sAg vorhanden, bleibt bei anschließender Zugabe der präparierten roten Blutkörperchen die Hämagglutination wegen der vorangegangenen Neutralisation des HB_sAg aus (Hämagglutinationshemmung).

Erythrocyten bedeckt mit HBAg



ANTIGENNACHWEIS

Testserum + anti-HBAg + HBAg-Erythrocyten → Agglu. = Serum neg
→ keine Agglu. = Serum pos

ANTIKÖRPERNACHWEIS

Testserum + HBAg-Erythrocyten ⟶ Agglu. → anti-HBAg ist im Serum

Obwohl dieser Test relativ einfach und zudem schnell durchzuführen ist, konnte sich die Hämagglutinationshemmung (HAH) in großen Routinelabors nicht durchsetzen. Das hat mehrere Gründe.

Der wichtigste Grund ist sicher, daß ein Hämagglutinationshemmungssystem wegen des zweistufigen Vorgehens (zunächst Antikörperzugabe zur Neutralisation des Antigens, dann erst Zugabe der antigenbeladenen Erythrocyten) störanfälliger und weniger empfindlich ist, als ein direktes Vorgehen wie die Hämagglutination.

Weitere Gründe waren zunächst weitgehend technischer Natur, die nach einiger Zeit jedoch gut gelöst werden konnten. Zum einen sind nicht alle Erythrocyten für eine Antigenbeschichtung geeignet. Die Blutkörperchen dürfen z. B. nicht allzu lange gelagert werden und müssen unter definierten Bedingungen gesammelt werden (EDTA-Röhrchen, 174). Hinzu kommt, daß zur Beschichtung hochgereinigtes Antigen zur Verfügung stehen muß, zu dessen Herstellung ein großer technischer Aufwand erforderlich ist (Ultrazentrifuge).

Außerdem hat sich bei radioaktiven Untersuchungen gezeigt, daß unvorbehandelte Erythrocyten sehr viel ungleichmäßiger mit Antigen beladen werden als chemisch besonders fixierte (175). VYAS stabilisierte die Erythrocytenmembran mit Difluor-dinitrobenzin, so daß die HB_sAg Beschickung gleichmäßiger wurde und die Zellen zudem nach dem Kuppeln mit dem Antigen länger haltbar waren.

PRINCE et al. (139) konnte durch eine andere Aufbereitung und Fixierung der Erythrocyten die Empfindlichkeit der HAH weiter steigern.

Zu diesen Problemen, die weitgehend gelöst wurden, kommt ein anderes auch bei der passiven Hämagglutination (PHA) vorhandenes Problem, daß die Methoden gegenüber dem RIA stark benachteiligen. Bei dem RIA ist das Kriterium "positiv" durch einen genauen und objektivierbaren Wert (counts per minute) definiert.

Dagegen verlangt das Ablesen der Hämagglutination etwas Erfahrung und ist zudem gerade bei niedrigen HB_sAg Titern nicht so eindeutig festlegbar wie beim RIA.
VYAS (171) gibt folgende Kriterien zur Beurteilung des Hämagglutinationshemmungstestes an: eine teilweise vorhanden Hämagglutinationshemmung bei der 1 : 2 Verdünnung wird als negativ betrachtet, definitive Hemmung bei der 1 : 2 Verdünnung wird als eine schwach positive Reaktion eingestuft, vollständige Agglutinationshemmung bei einer 1 : 4 Verdünnung und höheren Verdünnungsstufen wird als stark positiv angesehen.

Die technischen Probleme, die z. T. ja auch für die heute übliche passive Hämagglutination galten, sind weitgehend gelöst, von der Industrie werden mehrere fertige Sets zur indirekten Hämagglutination zum Nachweis des HB_sAg angeboten.
Die Vorteile der Hämagglutinationsmethoden (sowohl der HAH als auch der weiter unten besprochenen PHA) liegen in der einfachen Durchführung (man benötigt keinen Gammazähler), in der relativ kurzen Laufzeit (ca. zwei Stunden) und an ihrer großen Spezifität. Hinzu kommt bei der PHA die durchaus mit dem RIA zu vergleichende große Empfindlichkeit.
Für VYAS (144) war der wichtigste Vorteil der HAH die Spezifität des Testes, da nach seiner Meinung jeder falsch HB_sAg positive amerikanische Blutspender einen großen Verlust für das amerikanische Transfusionswesen darstellt.
Das Verfahren kann nach VYAS auch automatisiert werden (ist es mittlerweile auch, s. 93, 121), so daß die Testdurchführung weiter vereinfacht wird.
PRINCE stimmt im großen und ganzen mit VYAS überein, wenn er auch der Einführung der HAH als Routinemethode skeptischer gegenüber stand als VYAS (139). Immerhin konnte PRINCE mit dieser Methode 2 - 3 so viele HB_sAg positive Blutspender als mit der Überwanderungselektrophorese entdecken. Er sieht die Vorteile der HAH mehr auf Forschungsgebieten und hier besonders

zur Subtypisierung des HB_sAg wegen der großen Spezifität des Testes.

Zur Entdeckung eines Antigens (oder auch eines Antikörpers) ist es im allgemeinen sinnvoller, dieses direkt naczuweisen und nicht über eine Neutralisation, wie es bei der HAH der Fall ist. Mit anderen Worten; man belädt die vorbehandelten Erythrocyten zur Identifizierung des Antigens im Testserum mit einem spezifischen Antikörper und kann das Antigen dann bei Zugabe des Testserums im Fall einer Agglutination direkt nachweisen. Ein solches System ist viel weniger störanfällig als die HAH, die in zwei Schritten durchzuführen ist (71). Damit nimmt die Empfindlichkeit der Methode gleichfalls zu.

Bei der Testung auf HB_sAg mit Hämagglutinationsmethoden stand zunächst die HAH im Vordergrund, weil man damals noch keine potenten Antikörper hatte.
Das zeigte sich u. a. an der relativ frühen Arbeit von JUJI und YOKOCHI (81) zur PHA, die Schwierigkeiten bei der Spezifitätstestung offenbarte. In der Untersuchung (mittels formalinisierten tanninvorbehandelten Erythrocyten) wurden von 54 HB_sAg positiven Seren 50 als spezifisch erkannt, die restlichen waren unspezifisch, da mit normalem menschlichen IgG beladene Erythrocyten ebenfalls eine Agglutination hervorriefen. Nachdem man bessere (hochtitrige) Antikörper zur Verfügung hatte, setzt sich die PHA wegen der oben schon erwähnten geringeren Störanfälligkeit und der größeren Empfindlichkeit immer mehr durch. Die von Industrie heute angebotenen Systeme sind alles PHA-Methoden.
1973 veröffentlicht GERMAIN et al. (55) eine Arbeit zur vergleichenden Testung des HB_sAg. Sie findet, daß RIA und RCA (red cell agglutination) die gleiche relative Empfindlichkeit in Screening-Tests auf HB_sAg haben. Für die Antigentestung gibt

sie eine Empfindlichkeit von 1 200 bis 4 000 an (bezogen auf die Empfindlichkeitsstufe 1 bei der Immunodiffusion). Im Vergleich mit dem RIA Ausria 125 von den Abbott-Laboratories zeigte die PHA höhere Titer an, d. h. der von GERMAIN verwandte PHA-Test kann wahrscheinlich niedrigere HB_sAg Konzentrationen als der Ausria 125 entdecken.
In der Empfindlichkeit der Antikörpertestung wird der RIA von der PHA noch um ein Vielfaches übertroffen. HOLLINGER (75) kann ebenfalls bestätigen, daß bei der Antikörpertestung die PHA höhere Titerstufen ergibt als der RIA, während die beiden Methoden bei der Antigentestung etwa gleich empfindlich sind. KORETZ (86) findet im wesentlichen ähnliche Ergebnisse, darüberhinaus stellt er fest, daß ein mit der PHA-Methode HB_sAg positiv erkanntes Serum eher mit der Entwicklung einer Hepatitis oder einer Antikörperproduktion nach Transfusion korreliert als ein RIA positives Serum.
PETERSON, FRÖSNER und DEINHARDT (131) finden beim Vergleich einer Radioimmunmethode und einer passiven Hämagglutinationsmethode eine annähernd gleich große Empfindlichkeit. Die Autoren geben der PHA wegen der kurzen Versuchsdauer, dem geringeren Materialverbrauch und der einfachen Durchführung den Vorzug.

4.7. Andere Tests

Eine in anderen diagnostischen Untersuchungen weit verbreitete Methode, der Latexagglutinationstest (z.B. Rheumaserologie, Schwangerschaftsdiagnostik) wurde auch zur HB_sAg Testung herangezogen. Der große Vorteil liegt in der schnellen und einfachen Durchführung. Wegen der sehr vielen falsch positiven Ergebnisse konnte sich der Test jedoch nicht durchsetzen.. KLOSSNER et al. berichten von 13,7 % falsch positiven Ergebnissen bei einer vergleichenden Untersuchung (andere Methoden waren Überwanderungselektrophorese und Komplementbindungs-

reaktion) von 117 Seren (85).
WEWALKA (179) berichtet von 11 falsch positiven bei 22 reagierenden Seren aus einem Panel von 50 Seren.

Andere Autoren beurteilen den Test positiver (46).
Andere Tests wie Immunoadhärenz (123, 126) konnten sich wegen ihrer großen Störanfälligkeit nicht für die Routineuntersuchung durchsetzen. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß Antigen-Antikörper Komplexe Erythrocyten bzw. Thrombocyten zur Aggregation bringen können.
Methoden der Pathologie wie Immunfluorescenz zur Lokalisation von HB_sAg in Leberpunktaten bleiben ebenfalls Forschungszwecken vorbehalten.

4.8. Empfindlichkeitsvergleich

Zum Schluß noch einmal ein Vergleich der relativen Empfindlichkeit der Verfahren nach SCHOBER (155), basierend auf dessen Ergebnissen und Ergebnissen von VYAS (171) und GERMAIN (55).

Methode	Hb_sAg Nachweis	Anti-HB_sAg Nachweis
Immunodiffusion	1	1
Überwanderungs-elektrophorese	3 - 5	3 - 5
Latexagglutination	3 - 5	---
Komplementbindungs-reaktion	30 - 100	1 - 20
Radioimmunassay	1 200 - 4 000	4 000 - 10 000
Hämagglutination	1 200 - 4 000	4 000 - 50 000

5. Experimenteller Teil

5.1. Vorbemerkungen

In der Blutzentrale Tübingen wurde 1973/1974 eine vergleichende Untersuchung verschiedener Methoden zum Nachweis des HB_sAg durchgeführt. Es sollten Empfindlichkeit, Spezifität und Praktikabilität wie sie für ein großes Routinelabor wie die Tübinger Blutbank erforderlich sind, geprüft werden.
Diese Arbeit vergleicht zwei Hämagglutinationsmethoden mit zwei Überwanderungselektrophoresen. Die Methoden des Radioimmunassay im Vergleich mit zwei kommerziellen Überwanderungselektrophoresen, ("Hapindex" von Ortho Diagnostics und "Radpidophor" von Immuno Diagnostika) sind in der Dissertation von R. SCHÄUBLE besprochen. Eine Synopsis aller Methoden wurde in der Arbeit von Professor Schneider et al. publiziert (151, 153).

5.2. Methoden und Material

5.2.1. Nachweismethoden

In der Arbeit untersuchte Methoden:

Indirekte Hämagglutination:	Auscell (Abbott-Laboratories Chicago)
	Hepanosticon (Organon, München)
Überwanderungselektrophoresen:	Methode nach PESENDORFER (130)
	Modifikation einer Methode von BUSCH (29) nach SUGG (163)

5.2.2. Untersuchungsmaterial

Von Juli bis November 1973 wurden 1 041 Seren von Erstspendern

an der Abteilung für das Transfusionswesen der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen gesammelt. Die Seren wurden bis zur Untersuchung bei - 20 °C gelagert.

5.3. Technik der Methoden

5.3.1. Hämagglutinationsmethoden

Beide hier untersuchten Methoden sind indirekte Hämagglutinationsmethoden. Sie unterscheiden sich dadurch, daß bei "Auscell" von den Abbott-Laboratories, (Charge Nr. 36-359 Bw) formalinbehandelte menschliche Erythrocyten verwandt werden, die mit Meerschweinchen Antikörper beschichtet sind, während es bei "Hepanosticon" von Organon, (Charge Nr. 672 167) Hammelerythrocyten mit Anti-Hb_s vom Hammel sind.

5.3.1.1. "Auscell" (Abbott-Laboratories, Charge Nr. 36-359 Bw)

Diese indirekte Hämagglutinationsmethode beruht auf der Agglutination von DURACYTE^R-Zellen (formalinstabiliserte lyophilisierte menschliche Erythrocyten, die mit Anti-Hb_s vom Meerschweinchen beschickt sind) durch HB_sAg.
Wenn genügend HB_sAg im Testserum vorhanden ist, bilden die antikörperbeschichteten Zellen einen Komplex, nach außen sichtbar als unscharf begrenzter Fleck, während bei einer fehlenden Agglutination (HB_sAg negative Seren) die Erythrocyten einen scharf begrenzten kleinen Punkt am Boden der Platte bilden.
Der Test besteht aus einem Screening Test und einer Spezifitätstestung. Der Screening Test differenziert zunächst die Seren in reaktiv und nicht-reaktiv.
Alle im Screeningtest als reaktiv erkannten Seren müssen anschließend auf ihre Spezifität geprüft werden, da es Seren

gibt, die nicht spezifische, kreuzreagierende Substanzen enthalten. Diese unspezifischen Substanzen reagieren wie HB_sAg mit den DURACYTE-Zellen. Nach Angaben des Prospekts (Arbeitsanleitung) der Firma Abbott sind 5 - 50 % der im Screening Test positiven Seren bei der Spezifitätstestung endgültig positiv.

5.3.1.1.1. Screening-Test

Die Beschreibung folgt im wesentlichen der Anleitung der Firma Abbott (Arbeitsanleitung für Auscell).
Materialien:

1. Antikörper beschichtete DURACYTE-Zellen (stabiliserte lyophilisierte menschliche Erythrocyten mit Anti-HB_s vom Meerschweinchen) Die Zellen müssen vor Untersuchungsbeginn mit 3 ml Rekonstitutionslösung aufgelöst werden, dann aber innerhalb von 5 Tagen verbraucht werden.

2. Positives Kontrollserum, das durch 10-stündiges Erhitzen auf 60 °C weitgehend inaktiviert wurde, seine Antigenität aber behielt.

3. Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Seren, bestehend aus u. a. Gelatine, normalem menschlichem Serum, normalem Meerschweinchen Serum. Der pH-Wert beträgt 7,2.

4. Rekonstitutionslösung für die DURACYTE-Zellen aus 0,08 M Phosphatpuffer mit einem pH von 7,2.

5. Limbro-Wegwerfplatten (V-Form) zur Durchführung der Hämagglutination.

6. Pipetten und Wegwerfspritzen für 0,020 ml

7. Pipetten für 0,025 ml

8. Pipetten für 0,03 ml

9. Mikroverdünner von 0,025 ml (Cook-Microtiter) (auch Quirle genannt).

10. Go-no-go Tester: saugfähiges Papier zur Reinigung der Mikroverdünner.

Ablauf des Testes:

Zur Kontrolle muß auf jeder Platte ein positives Kontrollserum und eine Serumverdünnungspufferkontrolle (als negative Kontrolle) mitgeführt werden.

1. Auflösung der DURACYTE-Zellen in der Rekonstitutionslösung

2. Die Testseren und das menschliche Kontrollserum werden in dem Puffer auf 1 : 16 verdünnt. Dazu gibt man 0,02 ml Serum zu 0,3 ml Puffer.

3. Kennzeichnung der Platte zur späteren Identifikation der Seren.

4. Loch H 11 wird mit 0,025 ml Puffer und Loch H 12 mit 0,025 ml positivem Kontrollserum beschickt. (S. untenstehende Schemazeichnung einer Mikrotiterplatte).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5. Von jeder Serumverdünnung (1 : 16) wird je 0,025 ml mit einer sauberen Pipettenspitze (für jedes Serum eine neue) in das vorgesehene Loch der V-Platte gegeben.

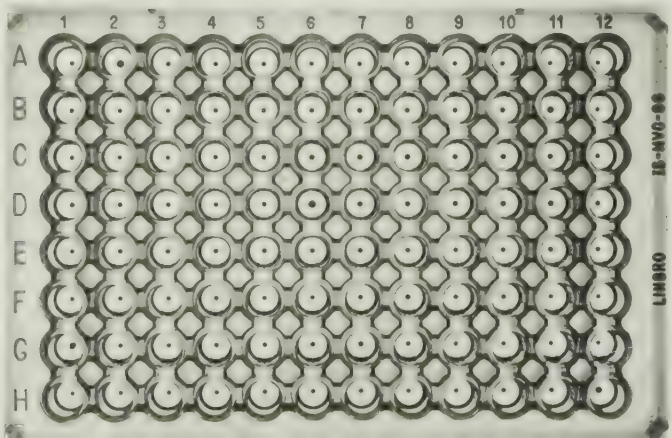
6. Zu jedem Loch kommen jetzt 0,025 ml der DURACYTE-Zellen-Lösung.

7. Durch leichtes Stoßen der Plattenseiten werden die Reagentien vermischt.

8. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Zimmertemperatur werden die Platten sorgfältig abgelesen.

Untenstehendes Photo zeigt die Vorrichtung mit Spiegel zur Ablesung der Testergebnisse.

Zur Interpretation der Ergebnisse dient folgendes Photo als Beispiel.



Die Ergebnisse sind nur dann verwertbar, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. H 11 als negative Kontrolle (Puffer und DURACYTE-Zellen) muß sich als scharf begrenzter kleiner Knopf zeigen.

2. H 12 als positive Kontrolle muß eine eindeutige Agglutination zeigen. Wenn H 11 nicht eindeutig negativ und/oder H 12 nicht eindeutig positiv ist, muß der Test wiederholt werden.

3. Auf dem obigen Photo zeigen folgende Seren eine Agglutination und sind daher als reaktiv einzustufen (die Spezifität muß noch zusätzlich geprüft werden).
   A 2, B 11, D 6, F 8, G 1.

Wie aus dem Photo hervorgeht, kann das Agglutinationsmuster stark variieren. Das Serum in F 8 hat sicher einen niedrigen Antigengehalt, der "Knopf" ist nur mäßig verbreitert und hat höchstens eine etwas unruhige Peripherie.

5.3.1.1.2. Spezifitätstestung

Materialien

1. menschliches Anti-HB_s zur Neutralisation des HB_sAg (Subtypen ad und ay)

2. Normales menschliches rekalzifiziertes Plasma (dieses Plasma ist HB_sAg negativ mit den empfindlichsten Methoden, die es zur Zeit gibt. Außerdem enthält es keine kreuzreagierenden Substanzen oder Antikörper gegen HB_sAg).

3. Duracyte - Zellen

Ablauf der Spezifitätstestung

1. Auflösen der Duracyte-Zellen wie oben beschrieben.
2. Für jedes Serum müssen zwei Röhrchen präpariert werden, auf ein Röhrchen kommen Serumnummer und X, auf das andere Serumnummer und Y.

3. 0,025 ml normales menschliches rekalzifiziertes Plasma wird in Röhrchen X gegeben.

4. 0,025 ml menschlicher HB_sAg Antikörper wird in Röhrchen Y gegeben.

5. Je 0,025 ml des zu untersuchenden Serums werden zu den Röhrchen X und Y gegeben.

6. Durchmischen und Inkubation der 1 : 2 Verdünnung des Serums bei Raumtemperatur.

7. Vorbereitung der Mikrotiter-Platte. Für jedes Serum werden zwei Reihen von Löchern benötigt, d. h. auf einer Platte können maximal sechs Seren auf Spezifität getestet werden.

8. 0,025 ml Puffer werden in jedes Loch gegeben.

9. 0,025 ml des inkubierten Testserums kommt von Röhrchen X in A 1. Von Röhrchen Y (Testserum und Anti-HB_s) werden 0,025 ml in A 2 gegeben. A 1 und A 2 stellen also 1 : 4 Verdünnungen des Serums dar. Entsprechendes gilt für A 3/4, A 5/6 usw.
   A 11/12 sind für die positive Kontrolle bestimmt, die wie ein Testserum behandelt wird.

10. Mit einem Cook'schen Mikrotiter-Verdünner werden die Seren verdünnt. Die Verdünnungsreihe endet in G 1/2, die eine 1 : 256 Verdünnung des Serums enthalten.
H 1 und H 2 enthalten nur den Serumverdünnungspuffer und dienen als Kontrolle.

11. Anschließend werden 0,025 ml der DURACYTE-Zellen in jedes Loch gegeben. Die Ergebnisse werden nach zweistündiger Inkubation bei Zimmertemperatur abgelesen.

Ergebnisse:

Dieser Test ermöglicht eine Differenzierung in spezifisch positive und in falsch positive Seren. Die Reaktivität der spezifisch positiven Seren wird durch den menschlichen Antikörper in dem Röhrchen Y absorbiert.
Der Test ist nur zu verwerten, wenn in der H-Reihe (Puffer und Erythrocyten) keine Agglutination vorhanden ist und die positive Kontrolle eine eindeutige Agglutination zeigt. Falls dies nicht der Fall ist, muß der Test wiederholt werden.

Neben diesen Kriterien müssen noch einige andere Punkte erfüllt sein, um Seren als spezifisch positiv betrachten zu können.

1. Der Titer in der X-Reihe (Serum und normales menschliches rekalzifiziertes Plasma) muß mindestens 1 : 16 sein, das heißt die Agglutination muß in den Reihen A, B und C vorhanden sein.

2. Der mit Testserum und menschlichem Antikörper erhaltene Titer in der Reihe Y muß mindestens 4-fach, (d. h. zwei Reihen darüber) geringer sein als der in der dazugehörigen X-Reihe erreichte.

3. Wenn in der X und Y Reihe ein Titer von 1 : 256 oder grö-

ßer erreicht wurde, muß der Test mit einer Anfangsverdünnung von 1 : 20 wiederholt werden.

5.3.1.2. "Hepanosticon" (Organon, München, Charge Nr. 672167)

Diese passive Hämagglutinationsmethode beruht auf der Agglutination von Hammelerythrocyten, die mit Anti-HB_s vom Hammel beladen sind.

5.3.1.2.1. Arbeitsanleitung für den Screening-Test

1. Der Inhalt der für die Anzahl der Blutproben benötigten Röhrchen mit Reagenz wird in 1 - 2 ml 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung resuspendiert und in einen Meßzylinder gegeben. Mit 0,9 %iger NaCl-Lösung ergänzt man das Volumen auf

   X x 2,2 ml (bei Verwendung von Röhrchen für 4 Teste)
   Y x 10,5 ml (Bei Verwendung von Röhrchen für zwanzig Teste)

   X = die Anzahl der verwendeten Röhrchen für 4 Teste
   Y = die Anzahl der verwendeten Röhrchen für 20 Teste.

   Meßzylinder schütteln, bis die Suspension homogen ist.

2. 0,5 ml Erythrozytensuspension in jedes der Sedimentationsröhrchen pipettieren.

3. In jedes Sedimentationsröhrchen 0,010 ml Serum oder Plasma hinzufügen.

4. Die Sedimentationsröhrchen in die Halterung des Ableseständers einsetzen und diesen gut schütteln, bis die Mischung

homogen ist (15 - 30 Sekunden).

5. Die Röhrchen im Ständer 1 1/2 - 2 Stunden unberührt sowie vibrations- und erschütterungsfrei bei Zimmertemperatur (15 - 25 °C) stehenlassen.

6. Nach diesen 1 1/2 - 2 Stunden liest man das Sedimentationsbild auf dem schrägen Bodenspiegel des Ständers ab.

5.3.1.2.2. Spezifitätstestung

Jedes im Screening Test positiv reagierende Serum muß noch zusätzlich auf seine Spezifität untersucht werden, da verschiedene Antikörper wie z. B. Anti-Forssman-Antikörper, infektiöse Mononucleose oder Antikörper gegen Gamma-Globuline tierischen Ursprungs manchmal unspezifische Reaktionen auslösen können. (156). Ebenso kann der Rheuma-Faktor des Menschen eine unspezifische positive Reaktion verursachen (157).

Arbeitsanleitung für die Spezifitätstestung:

01. Das Absorbens eines Röhrchens wird mit 10 ml 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung resuspendiert, schütteln, bis die Suspension homogen ist.

02. 5 ml dieser Erythrocytensuspension in ein Zentrifugenglas geben und 5 Minuten mit 1 200 x G zentrifugieren (2 600 UPM) Überstand vorsichtig wegwerfen.

03. Dem Sediment 0,10 ml der zu absorbierenden Probe hinzufügen.

04. 0,1 ml 0,9 %ige Natrium-Chlorid-Lösung hinzugeben, homogenisieren.

05. Das Röhrchen eine Stunde bedeckt bei 37 °C stehenlassen, dabei nach 30 und 60 Minuten homogenisieren.

06. Das Röhrchen 16 - 20 Stunden bei 2 - 8 °C zur Inkubation stehenlassen.

07. 0,30 ml 0,9 %ige Natrium-Chlorid-Lösung hinzufügen und homogenisieren.

08. 15 Minuten mit 1 200 x G zentrifugieren (2 600 UPM)

09. Überstand möglichst vollständig in ein Sedimentationsröhrchen pipettieren (ungefähr 0,4 ml).

10. Die Erythrocyten des Hepanosticon-Reagenz in 1/5 der üblichen Menge 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendieren, also in 0,42 ml bei Reagenzröhrchen für 4 Teste und in 2,1 ml bei Röhrchen für 20 Teste.

11. 0,1 ml der Suspension zum Überstand hinzupipettieren.

12. Die Sedimentationsröhrchen in die Halterung des Ableseständers einsetzen und diesen gut schütteln, bis die Mischung homogen ist (15 - 30 Sekunden).

13. Die Röhrchen im Ständer 3 Stunden unberührt sowie vibrations- und erschütterungsfrei bei Zimmertemperatur (15 - 25 °C) stehenlassen.

14. Nach 3 Stunden das Sedimentationsbild auf dem schrägen Bodenspiegel des Ständers ablesen.

5.3.2. Überwanderungselektrophoresen

In der Überwanderungselektrophorese wird die Eigenschaft von Antigen und Antikörper ausgenutzt, im elektrischen Feld in verschiedener Richtung zu wandern, das Antigen zur Anode und der Antikörper zur Kathode.

5.3.2.1. Methode nach Pessendorfer

PESENDORFER war der erste, der diese Methode im deutschsprachigen Raum zur Bestimmung des HB_sAg einsetzte (130).

5.3.2.1.1. Screening-Test

Materalien:

1. Glasplatte 22,5 x 7,5 cm

2. Agarose (Fa. Behring, Charge F 4103)

3. 0,128 M Barbital-Na-Acetatpuffer (Veronal-Puffer mit 24,438 gr Na-Barbital, 19, 428 gr Na-Acetat, 270 ml 0,1 N HCL, Aqua dest. ad 3 000 ml) pH zwischen 8,1 und 8,3 und einer Ionenstärke von μ = 0,128.

4. Anti-HB_s vom Kaninchen (Fa. Behring, Charge Nr. 2443 B, 2469 A, 2529 C, 2512 A, 2613 A).

5. Filterpapier 2043 b Mgl (Fa. Schleicher und Schüll)

6. Positives Kontrollserum (Lecca)

7. "Mikrophor-Kammer" der Fa. Boskamp

8. Netzgerät zur Einstellung einer konstanten Stromstärke.

Testdurchführung:

1. Durch Erhitzen (nicht kochen!) von 45 g Agarose und 60 ml Puffer im Wasserbad wird eine 0,75 % Agaroselösung hergestellt. Diese Menge reicht zur Herstellung von zwei Agaroseplatten. Je 30 ml der Lösung werden mittels einer Pipette auf die sorgfältig waagrecht liegende Glasplatte gegossen. Die Schichtdicke des Gels beträgt nach dem Erstarren ca. 1,8 mm. Frühestens 30 Minuten und spätestens 24 Stunden nach dem Gießen werden die Platten benutzt.

2. Mittels einer Lochstanze werden Löcher von 4 mm Durchmesser und einem Randabstand von 3 mm in Stromrichtung gestanzt. Eine Saugpumpe saugt das Gel aus den Löchern, die ein Volumen von 20 µl haben.

3. Anschließend werden mit je 20 µl der Seren die Doppellöcher gefüllt, die kathodenwärts von der Mitte der Platte liegen. In die drei ersten Löcher der ersten Doppelreihe kommen eine 1 : 16, 1 : 32 und 1 : 64 Verdünnung eines positiven Kontrollserums (für beide Überwanderungselektrophoresen vom gleichen Spender namens Lecca). In die folgenden Löcher werden die Probandenseren eingefüllt. Pro Platte werden nur zwei Doppelreihen gefüllt. Es ist eigentlich überflüssig zu erwähnen, daß das Testserum kathodenwärts (das Antigen wandert zur Anode) und der Antikörper anodenwärts (ebenfalls 20 µl) eingefüllt werden.

4. Die Pufferäume der Elektrophoresenkammer werden genauestens mit Puffer gefüllt. Die fertige Platte wird auf den Kühlblock der Kammer gelegt. Die Puffer-Gel-Brücke wird mit Filterpapier hergestellt, und zwar so, daß das Filgerpapier beidseits 1 cm auf das Gel reicht.

5. Anlegen einer Stromstärke von 64 m A. Die Laufzeit, die sofort nach der Füllung der Platte beginnen soll, beträgt 2 1/2 Stunden (Zeitschaltuhr).

6. Anschließend sorgfältiges Ablesen der Platte gegen einen schwarzen Untergrund, wobei die Platte schräg von unten beleuchtet wird.

Beurteilungskriterien:

1. Der Lauf wird nur gewertet, wenn das Kontrollserum noch in einem Titer 1 : 64 positiv reagiert.

2. Die Seren dürfen nicht bakteriell verunreinigt sein, um "Prozonenphänomene" zu vermeiden.

3. Kratzer in der Platte sind als Artefakte zu beachten.

5.3.2.2. Elektrophoretische Schnellmethode nach SUGG (163)

Die Methode ist eine Modifikation einer Schnellmethode von BUSCH und SINGH (29).

Materialien:

wie bei der Pesendorfer'schen Methode (1 - 7) Charge des verwendeten Antikörpers vom Kaninchen (Fa. Behring): 2413 A und

2443 B).

8. Netzgerät der Fa. Ortec (Modell 4 100, pulsed power).

Testdurchführung

Im wesentlichen wie bei der Pesendorfer'schen Methode. Zur elektrophoretischen Trennung wird das Netzgerät der Fa. Ortec mit folgender Einstellung eingesetzt: 400 V, 0,5 microfarad und 1 000 Impulse/sec. Die Arbeitsweise des Gerätes beruht darauf, daß ein Spannungsimpuls einen Kondensator auflädt und anschließend die im Kondensator gespeicherte Energie über den Widerstand der Elektrophoresekammer entladen wird. Dieser Entladungsvorgang läuft bei niedrigem Zellwiderstand schnell und bei hohem Zellwiderstand langsam ab (29).
Durch diese Arbeitsweise liefert das Gerät eine konstante Leistung. Am Zelleingang liegt eine konstante Spannung von 400 V. Die Stromstärke steigt von 100 - 120 m A auf 230 - 250 m A, um gegen Ende der Elektrophorese auf 200 - 220 mA abzufallen (163).

5.3.2.3. Spezifitätstestung

Die Spezifität der in beiden Überwanderungselektrophoresen positiv reagierenden Seren wurde nach dem gleichen Prinzip geprüft. Die Elektrophorese wurde jeweils nach den oben beschriebenen Methoden durchgeführt.
Das Prinzip der Spezifitätstestung besteht darin, daß die Reaktivität durch Absorption mit Anti-HB_s vom Menschen (Abbott-Laboratories Charge Nr. 730521) geprüft wird.
Dazu werden die im Screening-Test positiv reagierenden Seren mit der gleichen Menge Antikörper inkubiert. Eine spezifisch positive Reaktion wird durch Verschwinden der Reaktivität angezeigt.

Um die einzelnen Elektrophoreseläufe werten zu können, wurde auf jeder Platte ein positives Kontrollserum (Titer 1 : 16, 1 :32, 1 : 64) mitgeführt und ebenfalls zusätzlich absorbiert (also positive und negative Kontrolle).
Falls dieses Serum keine eindeutige Reaktion zeigte (positive Reaktion bis zum Titer 1 : 64 und Absorption durch Anti-HB_s) wurde der Lauf wiederholt. Die sonstigen Versuchsbedingungen (Stromstärke bzw. Spannung, Zeitdauer, etc.) waren genau die gleichen wie bei der Screening-Untersuchung.

5.4. Untersuchungsergebnisse

Durch den Methodenvergleich sollte bei der Untersuchung der 1 041 Erstspenderseren auf HB_sAg die Empfindlichkeit und die Spezifität der einzelnen Methoden geprüft und verglichen werden.

5.4.1. Vergleich der positiven Ergebnisse

Tabelle 1 gibt eine Synopse der Ergebnisse, die bei der Untersuchung der Erstspenderseren mit den Methoden der indirekten Hämagglutination ("AUSCELL" von Abbott und "HEPANOSTICON" von Organon) und der Überwanderungselektrophorese (Methode nach Pesendorfer und Modifikation einer elektrophoretischen Schnellmethode von BUSCH und SINGH nach SUGG) erzielt wurden.
Die indirekte Hämagglutinationsmethode von Abbott erwies sich am empfindlichsten, sie entdeckte 10 Seren als HB_sAg positiv. Es soll allerdings nicht verschwiegen werden, daß ein Radioimmunassay von Abbott (AUSRIA II) noch empfindlicher war und zwei weitere, sehr schwach positive Seren identifizierte. (Die Counts per minute dieser Seren lagen nur wenig über dem Grenzwert (151, 153).
In der Hämagglutination von Organon reagierten 15 Seren positiv,

wovon allerdings nach Absorption nur 8 Seren spezifisch positiv blieben.
Die beiden Überwanderungselektrophoresen zeigten, was die Zahl der entdeckten Seren betrifft, die gleiche Leistungsfähigkeit, mit diesen beiden Methoden wurden jeweils 8 HB_sAg positive Seren entdeckt.
Tabelle 2 zeigt, daß die einzelnen Methoden jeweils die selben Seren identifizierten, wobei Auscell die Seren Nr. 992 und Nr. 1037 als einzige Methode entdeckte.

5.4.2. Spezifität

Alle mit den Methoden der Überwanderungselektrophorese und der indirekten Hämagglutination positiv reagierenden Seren wurden zur Spezifitätstestung mit einem gleichen Volumen Anti-HB_s vom Menschen (Abbott-Laboratories, Charge Nr. 730 521) versetzt und nach Inkubation erneut untersucht. Die Reaktion war spezifisch, wenn sich jetzt keine Agglutination mehr nachweisen ließ (siehe Tabelle 1).
Bei der Methode der indirekten Hämagglutination von Organon wurde die Spezifität zusätzlich noch nach dem von der Firma angegebenen Schema geprüft. Die positiven Seren wurden dazu mit Hammelerythrocyten inkubiert, auf deren Oberfläche normales Gamma-Globulin vom Hammel ist. Absorption der Reaktivität zeigte in diesem Fall unspezifisch positive Untersuchungsergebnisse an, die durch im Testserum vorhandene Antikörper gegen Hammelprotein ausgelöst werden.
Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchung der Methode Auscell bei Durchführung nach der Versuchsanleitung von Abbott.
Auf eine Besonderheit ist hinzuweisen. Serum Nr. 992 wurde wegen seines niedrigen Titers auch in der 1 : 2 Verdünnung (Testserum und Puffer) geprüft, um die Kriterien der Absorption zu erfüllen. (Reduktion der Reaktivität in der Y-Reihe

um das Vierfache mindestens). Dieses Verfahren war zulässig, da das Serum mit der Radioimmunassaymethode AUSRIA II eindeutig positiv war, wenn auch mit sehr niedrigen Counts per minute.

5.4.3. Empfindlichkeit der Methoden.

Die Empfindlichkeit der Methoden wurde durch Vergleich der höchsten Titerstufen in den jeweiligen Methoden bestimmt.
Die geometrische Verdünnungsreihe wurde mit einem Serum hergestellt, das frei von HB_sAg und Anti-HB_s ist.
Die Ergebnisse zeigt Tabelle 5.
Die bei der indirekten Hämagglutinationsmethode von Auscell erreichten Titerwerte sind folgendermaßen erklärt: Die Ergebnisse wurden von drei Personnen abgelesen. Dabei wurde die Reaktivität in vier Grade eingeteilt, wobei vierfach positiv bedeutete, daß die entsprechende Titerstufe voll erreicht war. Ein dreifach positives Ergebnis bedeutete, daß von dieser Titerstufe der Wert abgezogen wurde, der drei Titerstufen der geometrischen Verdünnungsreihe niedriger lag.
Beispiel: ein dreifach positives Ergebnis in der sechsten Titerstufe (entsprechend einer 1 : 2048 Verdünnung) bedeutete einen Titer von 2048 - 256 = 1792.
256 war der Titer, der drei Stufen niedriger lag.
Ein zweifach positives Ergebnis dieser Stufe hieß, von dieser Titerstufe wurde der Wert abgezogen, der dem zwei Stufen niedriger liegenden Wert entsprach. Zum Beispiel bedeutete, 5 ++ ein zweifach positives Ergebnis in der fünften Titerstufe (entsprechend einer 1 : 32 Verdünnung). Nach Umrechnung (32 - 8) wurde ein Titer von 1 : 24 festgestellt.
Aus den so berechneten Titer der drei Untersucher wurde dann jeweils der Mittelwert gebildet. Dieses Verfahren wurde gewählt, um die Bewertung der Hämagglutination zu objektivieren.

Bemerkenswert ist, daß sich die einzelnen Ergebnisse der drei

Untersucher nur wenig, und wenn dann nur minimal unterschieden, ein Zeichen, daß man die Ergebnisse einer solchen Methode einigermaßen sicher bewerten kann.
Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen eindeutig die große Empfindlichkeit der Hämagglutination von Auscell.
Die drei anderen Methoden, die sehr viel weniger empfindlich waren, unterschieden sich untereinander nur wenig.

5.4.4. Empfindlichkeitsfaktoren.

Eine direkte Vergleichsmöglichkeit wird durch die Berechnung der Empfindlichkeitsfaktoren erreicht.
Es wurden hier nur die Seren zum Vergleich herangezogen, die von allen vier Methoden identifiziert wurden.
Zur Berechnung wurde folgendermaßen vorgegangen:
die höchste Titerstufe in der Pesendorfer'schen Methode als der relativ unempfindlichsten Methode wurde gleich 1 gesetzt.
Die höchste Verdünnungsstufe desselben Serums in den anderen Methoden wurde als Vielfaches davon angegeben und als Empfindlichkeitsfaktor bezeichnet.
Beim Vergleich der errechneten Werte in Tabelle 6 stellt man fest, daß sich die Methoden der Überwanderungselektrophorese nach SUGG und die indirekte Hämagglutination von Organon in der Empfindlichkeit nicht wesentlich unterscheiden.
Deutlicher noch als in Tabelle 5 kommt in dieser Tabelle die große Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination von Abbott zum Ausdruck.
Berechnet man die Empfindlichkeitsfaktoren getrennt nach Subtypen (mittels Rheophorese von Abbott bestimmt, Tabelle 4) so stellt man fest, daß die Überwanderungselektrophorese nach SUGG und Auscell eine größere "ad"-Spezifität haben, während die indirekte Hämagglutinationsmethode von Organon eine größere "ay"-Spezifität besitzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

5.4.5. T a b e l l e n

Tabelle 1: Anzahl der HB_sAg positiven Seren in den verschiedenen Methoden

Nachweismethode	Zahl der positiven Reaktionen	Nach Absorption mit Anti-HB_s unspezifisch positiv	spezifisch positiv
Überwanderungselektrophorese nach Pesendorfer	8	0	8
Modifizierteelektrophoretische Schnellmethode	8	0	8
Indirekte Hämagglutination "AUSCELL"	10	0	10
Indirekte Hämagglutination "HEPANOSTICON"	15	7[a]	8

[a] alle 7 unspezifisch positiven Reaktionen waren bei der Absorption mit Hammelerythrocyten, die mit normalem Gamma-Globulin beladen sind, erkannt worden.

Tabelle 2: Identifikation der HB_sAg positiven Seren mit den verschiedenen Methoden

Serum Nr.	AUSCELL		HEPANOSTICON		PESENDORFER		SUGG	
	pos.reagierend	spez.	reag.	spez.	reag.	spez.	reag.	spez.
194	+	+	+	+	+	+	+	+
318	+	+	+	+	+	+	+	+
474	+	+	+	+	+	+	+	+
662	+	+	+	+	+	+	+	+
992	+	+	-		-		-	
1 037	+	+	-		-		-	
be	+	+	+	+	+	+	+	+
kä	+	+	+	+	+	+	+	+
ke	+	+	+	+	+	+	+	+
Wi	+	+	+	+	+	+	+	+
16	-		+	-	-		-	
274	-		+	-	-		-	
387	-		+	-	-		-	
435	-		+	-	-		-	
736	-		+	-	-		-	
745	-		+	-	-		-	
780	-		+	-	-		-	

Tabelle 3: Spezifitätstestung bei "AUSCELL" (Abbott)

Titer	194		318		474		662		992		1 037		be		Kä		Ke		Wi	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
1 : 2									+	-										
1 : 4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1 : 8	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1 : 16	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1 : 32	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1 : 64	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1 : 128	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1 : 256	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-

X = Testserum + normales menschliches rekalzifiziertes Plasma

Y = Testserum + Anti-HB_s (Menschen)

Tabelle 4: Subtypen der Seren, mittels Rheophorese bestimmt

194	nicht bestimmbar
318	ad
474	ad
662	ad
992	nicht bestimmbar
1 037	nicht bestimmbar
Kä	ad
Ke	ad
Be	ay
Wi	ay

Tabelle 5: Titration der positiven Seren

Serum-Nr.	Endtiter			
	AUSCELL	HEPANOSTICON	SUGG	PESENDORFER
194	1 : 245	1 : 4	1 : 1	1 : 1
318	1 : 896	1 : 8	1 : 4	1 : 2
474	1 : 9432	1 : 16	1 : 16	1 : 16
662	1 : 7338	1 : 32	1 : 32	1 : 32
992	1 : 2	-	-	-
1 037	1 : 53	-	-	-
Be	1 : 25	1 : 16	1 : 2	1 : 4
Kä	1 : 2219	1 : 8	1 : 32	1 : 16
Ke	1 : 3072	1 : 8	1 : 8	1 : 4
Wi	1 : 642	1 : 8	1 : 8	1 : 8

Tabelle 6: Empfindlichkeitsfaktoren, bezogen auf die Überwanderungselektrophorese nach Pesendorfer

Serum-Nr.	PESENDORFER	SUGG	HEPANOSTICON	AUSCELL
194	1	1	4	245
318	1	2	4	448
474	1	1	1	589,5
662	1	1	1	229,3
Be	1	0,5	4	6,25
Kä	1	2	0,5	138,7
Ke	1	2	2	768
Wi	1	1	1	80,25
Mittlerer Empfindlichkeits faktor	1	1,41	2,2	414,125

Tabelle 7: Mittlere Empfindlichkeitsfaktoren, für die Subtypen "ad" und "ay" getrennt berechnet

Serum-Nr.	Subtyp	PESENDORFER	SUGG	HEPANOSTICON	AUSCELL
318	ad	1	2	4	448
474	ad	1	1	1	589,5
662	ad	1	1	1	229,3
Kä	ad	1	2	0,5	138,7
Ke	ad	1	2	2	768
Mittelwert des Empfindlichkeits-faktors für den Subtyp "ad"		1	1,6	1,7	434,7
Be	ay	1	0,5	4	6,25
Wi	ay	1	1	1	80,25
Mittelwert des Empfindlichkeits-faktors für den Subtyp "ay"		1	0,75	2,5	43,25

6..D i s k u s s i o n

6.1. Diskussion der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit untersuchte Anzahl von Erstspendern reicht nicht aus, statistisch signifikante Angaben zu machen. Dennoch bestätigen diese Ergebnisse die Zahlen der meisten Autoren, die mit größerem Material arbeiteten.
Bei dem Vergleich zwischen den beiden indirekten Hämagglutinationsmethoden Auscell und Hepanosticon mit zwei Methoden der Überwanderungselektrophorese erwies sich die Hämagglutinationsmethode Auscell am empfindlichsten, sie identifizierte zwei zusätzliche HB_sAg positive Seren.
Auch wenn der Radioimmunassay Ausria II noch empfindlicher ist (damit wurden zwei weitere Seren entdeckt, 151, 153) hat die fast gleich empfindliche Methode Auscell ihre Berechtigung. Wenn ein Arbeiten mit radioaktivem Material nicht möglich ist (die Strahlenschutzbestimmungen werden laufend verschärft) kann man Auscell als eine echte Alternative einsetzen.

Mit den oben dargestellten Untersuchungsergebnissen werden in etwa die gleichen Ergebnisse wie bei anderen Autoren gefunden.

PETERSON, FRÖSNER und DEINHARDT (131) konnten mit dieser Methode aus einem Panel von 60 Seren nur ein Serum weniger als mit dem RIA entdecken.
Wegen der leichten und wenig aufwendigen Durchführung in relativ kurzer Zeit (ca. drei Stunden für einen vollständigen Test) und der geringen Zahl nichtspezifischer Reaktionen halten die genannten Autoren den Test für durchaus geeignet zur Routineuntersuchung.
Ein weiterer Pluspunkt dieses Testes ist, daß die Ergebnisse eher mit der Posttransfusionshepatitis zu korrelieren scheinen als die des RIA (86).
Auch die 1974 von FRÖSNER erschienene Arbeit bestätigt zwar die etwas größere Empfindlichkeit des RIA, bevorzugt aber dennoch

die indirekte Hämagglutinationsmethode wegen ihrer relativen Schnelligkeit und Einfachheit (47).
Die zweite Hämagglutinationsmethode Hepanosticon, die in dem oben beschriebenen Methodenvergleich untersucht wurde, ist nach unseren Ergebnissen keine sinnvolle Alternative zum RIA, obwohl dieser Test am einfachsten durchzuführen ist. Einmal ist die Empfindlichkeit geringer als bei Auscell (mit nur acht positiven Seren entspricht sie in etwa der Empfindlichkeit der SUGG'SCHEN Methode), zum anderen traten bei unserer Untersuchung sehr viele falsch positive Ergebnisse auf, was natürlich in einer Blutspendezentrale wegen des mit der Klärung verbundenen Zeitverlustes nicht günstig ist. Obige Ergebnisse bezüglich der großen falsch positiven Zahl konnte auch durch SEIDL bestätigt werden (157). Von 31 im Screening Test positiven Seren waren nur 15 spezifisch positiv.

Die Deutsche Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhämatologie fordert die Einführung der Testung jedes gespendeten Blutes auf HB_sAg und zwar mit so empfindlichen Methoden wie Radioimmunassay oder indirekter Hämagglutination. Als Übergangslösung wird die Überwanderungselektrophorese empfohlen. Jedoch wird die Überwandungselektrophorese auch nach Einführung der empfindlichen Methoden in den Blutspendezentralen ihre Berechtigung haben, denn es wird immer wieder Situationen geben, in denen Blutkonserven dringend benötigt werden (z. B. Frischblut). Hier ist die SUGG'SCHE Methode der Überwanderungselektrophorese sicher mehr als eine Notlösung. Wie oben dargelegt, wurden mit dieser Methode nur zwei Seren weniger als mit Hämagglutinationsmethode Auscell entdeckt. Die andere Hämagglutination ergab sogar nur die gleiche Anzahl wie die Überwanderungselektrophorese und unterschied sich auch in der Nachweisgrenze (Titerverlauf) nur wenig.
Andere Autoren bestätigen die relativ gute Empfindlichkeit der Überwanderungselektrophorese (84).

6.2. Problem der Posttransfusionshepatitis

Am Schluß einer solchen Arbeit stellt sich die Frage, ob überhaupt und wenn, wie die Komplikation der Posttransfusionshepatitis vermieden werden kann. Neben Arbeiten, die nach Screening auf HB_sAg keinen Rückgang der Posttransfusionshepatitis verzeichneten (als Beispiel Arndt-Hanser 8 und PRINCE 169) geben die meisten Autoren andere Ergebnisse an. Die Lösung dieses Problems hängt jedoch sicher von mehreren Faktoren ab, nicht nur vom Screening auf HB_sAg.

6.2.1. Spender - Empfänger - Relation

Es spielt bei der PTH sicher nicht nur das Vorhandensein von HB_sAg im Spenderblut eine Rolle, sondern auch die individuelle Disposition des Empfängers.
Es gibt Beobachtungen, nach denen Transfusion von HB_sAg positiven Blutes keine Hepatitis hervorrief, während Transfusion HB_sAg negativen Blutes eine Serumhepatitis verursachte (7, 61, 76, 149).

6.2.2. Empfindlichkeit der Methoden und Infektionstiter

Hinzu kommt, daß die Nachweisgrenze der Methoden weit unter der Infektionsgrenze liegt. Ein Beispiel aus BARKERS Arbeit (11) mag dies verdeutlichen. Ein Serum mit einem sehr niedrigen Titer in der Komplementbindungsreaktion (1 : 10) konnte seine Infektiosität in 10^4-facher Verdünnung behalten. Die Fähigkeit, eine Antigenämie zu erzeugen, blieb sogar noch in der 10^7-fachen Verdünnung des Serums erhalten. Diese Infektions-

grenzen liegen weit unter den gegenwärtig möglichen Nachweisgrenzen.
Die Forderung nach sehr empfindlichen Methoden ist durchaus berechtigt (was ja auch die Ergebnisse dieser Arbeit einwandfrei demonstrieren, da mit der empfindlicheren Methode eindeutig mehr HB_sAg positive Spender identifiziert wurden).
Andererseits stimmen die meisten Autoren darin überein, daß durch Screening auf HB_sAg alleine die Posttransfusionshepatitis wohl nur zu senken, aber kaum ganz zu eliminieren ist.
GOCKE schätzt 1970, daß man durch Screening auf HB_sAg mit der Agargeldiffusion die PTH um 25 % zu senken ist (59).
BARKER bestätigt diese Zahlen und meint, daß 90 % der HB_sAg positiven Seren entdeckt werden können, man die PTH jedoch mit Screening allein nur um 25 % senken könne (12).
Auch der RIA kann nicht alle HB_sAg positiven Seren identifizieren, wie es ALTER in seiner Arbeit formulierte (7).
HOLLINGER ist ebenfalls der Ansicht, daß sich mit der HB_sAg Testung alleine die PTH nur ungenügend senken lasse (76).

6.2.3. Spenderpopulation

Einen wesentlichen Einfluß auf die PTH-rate hat die Zusammensetzung der Spenderpopulation.
So sollte bestimmtes Spenderblut schon von vornherein von der Transfusion ausgenommen werden. Dazu gehören einmal Spender mit erhöhten Transaminasenwerten. Damit ist die Gruppe der aktiven Hepatitiden schon ausgeschlossen. Auch manche chronischen HB_sAg Träger werden dadurch erfaßt (110). In der Gruppe der kommerziellen Spender (s. u.) sind die SGOT-Werte signifikant höher als bei freiwilligen Spendern (110). Eine so simple Methode wie die körperliche Untersuchung des Spenders sollte ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Spender mit Zeichen der Leberbeteiligung (Spider naevi, Ascites, Ikterus, Hepatospleno-

megalie) sollten von vornherein vom Blutspenden ausgeschlossen werden.
Ein in den USA großes Problem, die drogensüchtigen Blutspender, ist bei uns noch nicht so aktuell. Diese Gruppe sollte, weil hoch mit HB_sAg durchseucht vom Spenden ausgeschlossen werden.
Eine weiter hochdurchseuchte Population stellen die Commercial donors dar.
Fast alle Autoren fordern den Ausschluß dieser Gruppe vom Blutspenden (z. B. 7, 109), obwohl das für die USA erhebliche Versorgungsproblem bedeutet
Bei uns in der Bundesrepublik stellt sich dieses Problem noch nicht, unsere Spender erhalten als Gegenleistung eine kleine Aufwandsentschädigung.
Das schwierigste Problem stellen die chronischen HB_sAg Träger dar, die körperlich gesund sind.
Diese Seren enthalten möglicherweise so niedrige Titer, daß sie selbst mit empfindlichen Methoden nicht zu entdecken sind.
Zur besseren Kontrolle bis zum Ausschalten dieser Spender sollten die Empfänger bis zu 6 Monate nach der Transfusion kontrolliert werden auf mögliche Reaktionen (Hepatitis, Antigenämie, etc.) (109). Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung chronischer HB_sAg Träger stellt der Nachweis von Anti-HB_c dar.
HOOFNAGLE (78) wies diesen Antikörper nach in 1 % der freiwilligen Spender, in 98 % bei HB_sAg positiven Spendern und in 100 % bei chronischen HB_sAg Trägern.

Wie weit durch alle oben genannten Verfahren sich die PTH senken läßt, bleibt abzuwarten. Bis zur endgültigen Lösung des Problems der PTH (u. U. durch eine Impfund) ist es sicher nötig, die Nachweismethoden für die HB_sAg immer weiter zu verfeinern, d. h. empfindlicher und spezifischer zu gestalten, um möglichst auch niedrige HB_sAg Titer zu identivizieren. Denn das eine größere Empfindlichkeit mehr HB_sAg Träger identifiziert, wurde durch obige Arbeit nachgewiesen.
CHALMERS wies an einem Zahlenbeispiel nach, daß ein Screening Test trotz hoher Kosten letztlich wirtschaftlicher ist als eine

Hepatitis. Screening-Untersuchungen (HB_sAg Test, Transaminasenbestimmung) kosten pro Blutkonserve ca. 3 Dollar, rechnet man die jährlich durch die PTH verursachten Kosten auf eine Konserve um, so kommt man auf 30 Dollar je Konserve (31).
In diesem Sinne ist auch die Einführung einen neuen Testes zu sehen dem Enzymimmunoassay, dessen Empfindlichkeit dem Radioimmunassay entspricht, aber lange nicht so aufwendig und teuer ist (132).

6.2.4. Krankenhaushygiene

Schließlich ist es zu bedenken, daß nicht alle sogenannten Posttransfusionshepatitisfälle auch wirklich Hepatitiden nach Transfusionen sind. Viele im Krankenhausmilieu erworbenen Hepatitiden sind auf direkten oder indirekten Kontakt mit infektiösen Personen (Patienten oder Medizinpersonal)zurückzuführen.
Die ZUCKERMAN'SCHE Arbeitsgruppe verglich die Häufigkeit der Hepatitis in einer transfundierten Gruppe vom Patienten mit einer nichttransfundierten. Dabei fand man in der nichttransfundierten Gruppe fast halb so viele Hepatitiden als in der transfundierten Gruppe (187).
Für die Zukunft heißt das, daß die Infektionsmöglichkeiten im Zusammenhang mit der allgemeinen Krankenhaushygiene eingehender erforscht werden müssen.

7. Zusammenfassung

Die Entdeckung des Zusammenhanges zwischen HB_sAg und Posttransfusionshepatitis führte dazu, daß die Blutkonserven routinemäßig auf HB_sAg untersucht werden. So fordert die Deutsche Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhämatologie 1974, daß jedes gespendete Blut auf HB_sAg geprüft werden muß.
Die zunächst eingesetzten relativ unempfindlichen Methoden wie Agargeldiffusion, Komplementbindungsreaktion und Überwanderungselektrophorese konnten die Zahl der PTH insgesamt kaum ändern.
Um dem Ziel einer Elimination der PTH näherzukommen, führte man hochempfindliche Methoden wie Radioimmunassay und indirekte Hämagglutination ein. Durch obige Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die indirekte Hämagglutination eine große Empfindlichkeit in der Testung auf HB_sAg besitzt und durchaus für den Einsatz in Blutspendezentralen geeignet ist wegen ihrer einfachen und wenig aufwendigen Durchführung.
Die Tübinger Blutspendezentrale hat sich jedoch wegen der noch größeren Empfindlichkeit und der Möglichkeit des Umgangs mit radioaktivem Material für die Methode des Radioimmunassay entschieden. Dennoch kann es in einer Blutspendezentrale Situationen geben, in denen man nicht auf die Ergebnisse dieses empfindlichen, aber ca. 3 - 5 Stunden dauernden Tests warten kann.
In dringlichen Fällen hat die elektrophoretische Schnellmethode nach SUGG durchaus ihre Berechtigung. Diese Methode ist zwar gegenüber der RIA-Technik unempfindlicher. Im Hinblick auf Spezifität ist sie jedoch anderen Verfahren gleichwertig. Der große Vorteil ist in der Ablesbarkeit der Ergebnisse bereits nach 30 Minuten begründet. Sie wurde als Routinemethode bei Dringlichkeitsfällen in dieser Abteilung übernommen.

8. Literaturverzeichnis

001. AACH, R.D., GRISHAMI, W., PERKER C.,
Detection of australia antigen by radioimmunassay
Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 1 056 - 1 060, Nr. 5, May 1971

002. ALMEIDA, J.D., WATERSON, H.P.,
Immune complexes in hepatitis
Lanset 1969, 2, 983 - 986

003. ALMEIDA, J.D., ZUCKERMAN, A.J., TAYLOR, P.E., WATERSON, H.P.,
Immune elctron microscopy of the Australia serum hepatitis antigen
Microbios 1969, 2, 117 - 123

004. ALMEIDA, J.D., RUBINSTEIN, D., STOTT, E.J.,
New antigen-antibody system in Australia antigen positive hepatitis
Lancet 2, 1 225 - 1 227, 1971

005. ALTER, H.J., BLUMBERG, B.S.,
Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen)
Blood, 27, 297 - 309, 1966

006. ALTER, H.J., HOLLAND, P.V., PURCELL, R.H.,
Counterelectrophoresis for detection of hepatitis associated antigen: methodology and comparison with gel diffusion and complement fixation
J. Lab. Clin. Med. 77, 1000 ff. 1971

007. ALTER, H.J., HOLLAND, P.V., PURCELL, R.H., et al.
Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B antigen positive donors
Annuals of Internal Medicine, 77, No. 5, 691 - 699, 1972

008. APOSTOLOV, K., BAUER, D.J., SELWAY, J.W.T., FOX, R.A.,
Dudley F.J., SHERLOCK, S.
Australia antigen in urine
Lancet 1, 1274, 1971

009. ARNDT-HANSER A., PYKA, R.,
Blood bank service screening of Australia antigen and antibodies at Mainz, Germany
Vox sang. 24, Suppl. 72 - 75 (1973)

010. BARKER, L.F., SMITH, K.O., GEHLE, W.D., SHULMAN, N.R.,
Some antigenic and physical properties of virus like particles in sera of hepatitis patients
J. Immunol. 102, 1 529 - 1 539, (1969)

011. BARKER, L.F., SHULMAN, N.R., HIRSCHMAN R.J., MURRAY R., RATNER F., DIEFENBACH W.C.L., GELLER H.M.
Transmission of serum hepatitis
J. Amer. Med. Ass. 211, 1509 (1970)

012. BARKER L.F., PETERSON M.R.
Detection of hepatitis associated antigen and antibody. Comparison of methods and their application
Can. Med. Ass. J. 106, 486 ff, 1972

013. BANCROFT, W.H., MUNDON F.K., RUSSEL P.K.,
Detection of additional antigenic determinants of Hepatitis B Antigen
J. Immunol. 109, 842 - 848, 1972

014. BAYER M.E., BLUMBERG B.S., WERNER B.
Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down syndrome and hepatitis
Nature 218, 1057 - 1059, 1968

015. BECKER M.D., SCHEUER P.J., BAPTISTA A., SHERLOCK S.:
Prognosis of chronic persistent hepatitis
Lancet I, 53 - 57, 1970

016. BERTHOLD H., KLEINE N., MÜLLER G.,
Au SH Antigen and transfusion hepatitis. A prospective study on the frequency and prevention of transfusion hepatitis
Zentralbl. Bakt. (orig. A) 220, 230 - 234, 1972

017. BIANCHI P.,
Occurence of Australia antigen in chronic hepatitis in Italy
Gastroenterology 63, 482 - 485, 1972

018. BLAINEY J.D., EARLE A., FLEWETT T.H., WILLIAMS L.K.T.:
Is the urine infective in serum Hepatitis?
Lancet I, 797, 1971

019. BLUMBERG B.S., RIDELL N.M.:
Inherited antigenic differences in human serum beta lipoproteins.
J. Clin.Invest. 42, 867 ff, 1963

020. BLUMBERG B.S.,
Polymorphisms of serum proteins and the development of isoprecipitins in transfused patiens
Bull NY Acad Med 40, 377 ff, 1964

021. BLUMBERG B.S.
Multiple antigenic specifities of serum lipoproteins detected withsera of transfused patients
Vox sang. 9. 128 - 145 (1964)

022. BLUMBERG B.S., HARVEY M.D., ALTER H.J., VISNICH S.:
A "new" antigen in leukaemia sera
J. Amer. med. Ass. 191, 541 ff, 1965

023. BLUMBERG B.S., GERSTLEY B.J.S., HUNGERFORD D.A. et al.:
A serum antigen in Down's syndrome, leukaemia and hepatitis
Ann. Int. Med. 66, 924 - 931, 1967

024. BLUMBERG B.S., MELARTIN L., LECHAT M., GUINTO RA.:
Association between lepromatous leprosy and Australia antigen
Lancet II, 173 f, 1967

025. BLUMBERG B.S., SUTNICK A.J., LONDON W.T.,
Hepatitis and leukaemia : their relation to Australia antigen
Bull. NY Acad. Med. 44, 1 566 - 1 586, 1968

026. BLUMBERG B.S.
The nature of Australia antigen : infectious and genetic characteristics
Prog. Liver Dis. 4, 367 - 379, 1972

027. BOND H.E.
Isolation and physicochemicsl characteristics of HBA_g
in : Hepatitis and Blood Transfusion ed. Vyas G.N., PERKINS H.S., SCHMID R., 1972 Grune and Stratt on NY

028. BRIGGS W.A., LAZARUS J.M., BIRTCH A.G., HAMPERS C.L., HAGER E.B., MERILL J.P.,
Hepatitis affecting Hemodialysis and transplant patients
Arch. Intern. Med. 132, 21 - 28, 1973

029. BUSCH H., SINGH M.
Schnelltest zur AU/SH-Antigen-Bestimmung
Ärztl. Laboratorium, 18 : 40 - 44, 1972

030. CECIL - LOEB, BEESON and Mc DERMOTT
Textbook of medicine
Saunders, 1971, Seite 1 391

031. CHALMERS T.C.
Hepatitis B Antigen in blood donors
in: VYAS G.N., PERKINS H.A., SCHMID R.: Hepatitis and Blood Transfusion, Grune and Stratton NY, 1972

032. COOK, R.J.
Reversed passive hemagglutination systems for the estimation of Tetanus toxins and antitoxins
J. of Immunology, 8, 74 f, 1965

033. COOKSLEY W.G.E., POWELL L.W., MISTELLIS S.P., OLSEN G., MATHEWS J.D., MACHAY J.R.:
Australia antigen in active chronic hepatitis in Australia
Austr. NZ. J. Med. 3, 261 - 265, 1972

034. COSSART Y.E., FIELD A.M., HARGREAVES F.D., PORTER A.A.,
Morphology and immunological properties of Australia/SH antigen in Hepatitis
Microbios 3, 5 - 14, 1971

035. COSSART Y.E., FIELD A.M.
Virus like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis
Lancet I, 848, 1970

036. CREUTZFELDT W., SEVERID H., SCHMITT E., GALLISCH E. et al.
Untersuchungen über die Häufigkeit und Verlauf ikterischer und anikterischer Transfusionshepatitiden
Dtsch. med. Wschr. 91, 1 813 - 1 820, 1966

037. DANE D.S., CAMERON C.H., BRIGGS M.
Virus like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis
Lancet I, 695 - 698, 1970

038. De GROOT J., DESMET V. J., GEDICK P., KORB G., POPPER, H., SCHERER P.J., SCHMID M., THALER H., UHLINGER E., WELPER W.,
A classification of chronic hepatitis
Lancet II, 626 - 628, 1968

039. Del PRETE S., CONSTANTINO D., DOGLIA M.,
Detection of a new serum antigen in three epidemics of short incubation hepatitis.

040. DUDLEY F.J., FOX R.A., SHERLOCK S.,
Relationship of hepatitis associated antigen to acute and chronic liver injury
Lancet II, 1 - 3, 1971

041. FERIS A., KALDOR J., GUST J.D., GROSS G.,
Faecal antigen in viral hepatitis
Lancet II, 243 - 244, 1970

042. FINDLAY G. M., MARTIN N.H., MITCHELL J.B.
Hepatitis after Yellow fever inoculation
Lancet II, 301 - 307, 340 - 344, 365 - 370, 1944

043. FLAUM A., MALMROS H., PERSSON E.,
Eine nosocomiale Icterusepidemie
Acta. med. scand. 16, 544 - 547, 1926

044. FOREST J.N., DISMUKES W.E., CHALMERS T.C.,
Dialysis associated hepatitis in 108 US hemodialysis units
Clin. Res. 16, 383 f, 1968

045. FREEMAN G.,
Epidemiology and incubation period of jaundice following yellow fever vaccination
Amer. J. Trop. Med. 26, 15 - 32, 1946

046. FRITZ R.B., RIVERS S.L.,
Hepatitis associated antigen : detection by antibody sensized latex particles
J. of Immunol. 108, 108 - 111

047. FRÖSNER G.G., PETERSON D.A., DEINHARDT F.,
Erprobung eines Haemagglutinationstestes für Hepatitis B Antigen
Zbl. Bakt. Hyg. Abt. A, 227, 378 - 382, 1974

048. FRÖSNER G.G., FRÖSNER H.R., HAAS H., SUGG U., SCHNEIDER W.,
Häufigkeit und Titer von Hep. A-Antikörpern in verschiedenen Altersgruppen der südwestdeutschen Bevölkerung
Schweizer Med. Wschr. im Druck

049. GARIBALDI R.A., COLETTE M., RASMUSSEN C.M., HOMLMES A.W., GREGG M.B.,
Hospital acquired serum hepatitis
J. Amer. med. ass. 219, 1 577 - 1 580, 1972

050. GARIBALDI R.A., et al.
Hemodialysis associated hepatitis
J. Amer. med. ass. 225, 384 - 389, 1973

051. GERIN J.L., PURCELL R.H., HOGGAN MD., HOLLAND P.V., CHANOCK R.M.,
Biophysical properties of Australia antigen
J. Virol. 4, 763 - 768, 1969

052. GERIN J.L.
Characterization of Hepatitis B antigen
in: VYAS G.N., PERKINS H.A., SCHMID R., Hepatitis and Blood Transfusion, Grune and Stratton NY, 1972

053. GERLICH W.,
Größenbestimmung biologischer Partikel durch Gelchromatographie an Sepharose 6 B
Z. Naturforschung 26 b, 1 040, 1971

054. GERLICH W., MAY G.,
Hepatitis assoziiertes Antigen: Reinigung und Eigenschaften
Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A, 224, 49 - 60, 1973

055. GERMAIN K.H., STURDIVANT S.K., RICHTSEL W.A.
Evaluation of a red cell agglutination test for detection of Australia antigen (HB A_g)
Appl. Microbiol. 25, 524 - 527, 1973

056. GILES J.P., Mc COLLUM R.W., BERNDTSON L.W., KRUGMAN S.,
Viral Hepatitis : Relation of Australia/SH Antigen to Willowbrook MS-2 strain
New. Engl. J. Med. 281, 119 - 122, 1969

057. GOCKE D.J., KAVEY N.B.,
Hepatitis antigen: Correlations with disease and infectivity of blood donors
Lancet I, 1 055, 1969

058. GOCKE D.J., GREENBERG H.B., KAVEY N.B.:
Hepatitis B Antigen: detection of infectious blood donors
Lancet II, 248, 1969

059. GOCKE D.J., GREENBERG H.B., KAVEY N.B.,
Correlation of Australia Antigen with posttransfusionshepatitis
J. Amer. med. ass. 212, 877 - 879, 1970

060. GOCKE D.J., HOWE C.,
Rapid detection of Australia antigen by counter-immunoelectrophoresis
J. Immunol. 104, 1031 f, 1970

061. GOCKE D.J.,
A prospective study of posttransfusionshepatitis
J. Amer. med. ass. 219, 1 165 - 1 170, 1970

062. GOCKE D.J.,
Detection of Hepatitis associated antigen: electrophoretic assay procedures
in: VYAS G.N., PRTKINS H.A., SCHMID R.,
Hepatitis and Blood Transfusion, Grune and Stratton,
NY. 1972

063. GOCKE D.J.,
New faces of viral hepatitis
Disease a month, 1 - 32, 1973

064. GORDON J., BERBERIAN M., STEVENSON D., REDEKER A.G.,
Distribution of Hepatitis B antigenic determinants in different forms of viral hepatitis
J. Inf. Dis. 126, 569 - 573, 1972

065. GREENMAN R.L., ROBINSON W.S.,
DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate
J. Virol. 13, 1 231 - 1 236, 1974

066. GROB P.J., JEMALKA H.J.,
Fecal SH-antigen in acute hepatitis
Amer. J. Dis. Child, 123, 400 f, 1972

067. HAVENS W.P., WARD R., DRILL V.A., PAUL J.R.,
Experimental production of hepatitis by feeding icterogenic materials
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 206 - 208 (1944)

068. Hepatitis and renal dialysis, editorial
Br. Med. J. 2, 1 199 - 1 200, 1965

069. Hepatitis Surveillance Report Nr. 30
Center Disease control, US Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, 15 - 30, 1969

070. HIRATA A.A., BRANDRISS M.W.,
Passive Hemagglutination procedures for protein and polysaccharide antigens using erythrocytes stabilized with aldehydes
J. Immunol. 100, 641 - 646, 1968

071. HIRATA A.A., EMERICK A.J., BOLEY W.E.,
Hepatitis B virus antigen detection by reverse passive hemagglutination
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, 761 - 763, 1973

072. HIRSCHMAN R.J., SHULMAN N.R., BARKER L.F., SMITH K.O.,
Virus like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis
J. Amer. med. ass. 208, 1 667 - 1 670, 1969

073. HIRSCHMAN S.Z., VERNACE S.J., SCHAFFNER F.,
DNA polymerase in preparations containing Australia antigen
Lancet II, 1 099 - 1 103, 1970

074. HOLLAND P.V., PURCELL R.H., SMITH H., ALTER H.J.,
Subtyping of hepatitis B Antigen: simplified technique with counterelectrophoresis
J. Immunol. 109, 420 - 425, 1972

075. HOLLINGER F.B., VORNDAM V., DREESMAN G.R.,
Assay of Australia antigen and antibody employing double - antibody and solid-phase radioimmunoassay techniques and comparison with the passive hemagglutination methods
J. Immunol. 107, 1 099 - 1 111, 1971

076. HOLLINGER F.B., AACH R.D., GITNICK G.L., ROCHE J.K., MECKNICK J.L.,
Limitations of solid-phase radioimmunoassay for HB Ag in reducing frequency of post-transfusion hepatitis
N. Engl. J. Med. 289, 385 - 391, 1973

077. HOLZBACH R.T.,LEON M.A.,
Posttransfusion viral hepatitis and the hepatitis associated antigen
Ohio State Med. J. 67, 329 - 332, 1971

078. HOOFNAGLE J.H., GERETY R.J., NILY, BARKER L.F.,
Antibody to hepatitis B core antigen
N. Engl. J. Med. , 1 336 - 1 340, 1974

079. JOKELAINEN P.T., KROHN K., PRINCE A.M., FINLAYSON N.D.C.,
Electron microscopic observations on virus-like particles associated with SH antigen
J. Virol. 6. 685 ff, 1970

080. JOWZIAK W., KOSCIELAK J., MADALINSKI K., BRZOSKO W.J.,
RNA of Australia antigen
Nature New Biol. 229, 92 - 94, 1971

081. JUJI T., YOKOCHI T.,
Hemagglutination technique with erythrocytes coated with specific antibody for detection of Australia antigen
Japan. J. Exp. Med. 39, 615 ff, 1969

082. KAPLAN P.M., GREENMAN R.L., GERIN J.L., PURCELL R.H., ROBINSON W.S.,
DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen
J. Virol. 12, 995 - 1 005, 1973

083. KIM C.Y., TILLES J.G.,
Purification and biochemical characterization of hepatitis B antigen
J. Clin. Invest. 52, 1 176 - 1 186, 1973

084. KISSLING R.E., BARKER L.F.,
Evaluation of assay methods for Hepatitis associated antigen
Appl. Microbiol. 23, 1 037 - 1 046, 1972

085. KLOSSNER M.L., WILLMAN K.,
Latex test, complement fixation and immunoelectrosmophoresis in detection of Australia antigen
Lancet I, 322 - 323, 1973

086. KORETZ R.L., KLAHS D.R., RITMAN S., DAMUS K.H., GITNICK G.L.,
Posttransfusion hepatitis in recipients of blood screened by newer assays
Lancet I, 694 - 696, 1973

087. KROHN K., FINLAYSON N.D.C., JOKELAINEN P.T., ANDERSON K.E., PRINCE A.M.,
Electron microscopial and immunological observations on the serum hepatitis antigen in primary biliary cirrhosis
Lancet II, 379 - 383, 1970

088. KRUGMAN S., WARD R., GILES J.P.,
The natural histiory of infectious hepatitis
Amer. J. Med. 32, 717 - 728, 1962

089. KRUGMAN S., GILES J.P.,
Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection
J. Amer. med. ass. 200, 365 - 373, 1967

090. KRUGMAN S., GILES J.P.,
Viral hepatitis - new light on an old disease
J. Amer.med. ass. 212, 1 019 - 1 029, 1970

091. KRUGMAN S., GILES J.P., HAMMOND J.,
Hepatitis virus : effect of heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strain
J. Infect. Dis. 122, 432 - 436, 1970

092. KRUGMAN S., HOOFNAGLE J.H., GERETY R.J., KAPLAN P.M., GERIN J.L.,
Viral hepatitis Type B : DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen
N Engl. J. Med. 290, 1 331 - 1 335, 1974

093. KWAK K.S., STURGEON P., GITNICK G.L.,
Automated continuous flow hemagglutination inhibition test for hepatitis B antigen in blood
Vox sang 25, 97 - 104, 1973

094. Le BOUVIER G.L., Mc COLLUM R.W.,
Australia (Hepatitis associated) antigen : physicochemical and immunological characterizations
Advanc. Virus Res. 16, 357 - 396, 1970

095. Le BOUVIER G.L.,
Seroanalysis by immunodiffusion. The subtypes of type B hepatitis virus
in: VYAS G.N., PERKINS H.A., SCHMID R.: Hepatitis and Blood Transfusion, Grune and Stratton , NY, 1972

096. Le BOUVIER G.L.,
Subtypes of Australia antigen and hepatitis B virus
J. Amer. med. ass. 222, 928 - 930, 1972

097. LIPP D.,
A study comparising three techniques for detection of Hepatitis associated antigen
Am. J. Med. Technol. 38, 446 - 453, 1972

098. LOEB L.A., WILLIAMS R.O., SUTNICK A.J., O'CONNEL A., MILLMAN J.,
DNA polymerase activity in human serum : studies with Au/Sh antigen
Proc. Soc. Exp. Bid. Med. 143, 519 - 525, 1973

099. LONDON W.T.,
An epidemic of hepatitis in a hemodialysis unit: Australia antigen and differences in host response
N Engl. J. Med. 281, 571 - 578, 1969

100. LONDON W.T., SUTNICK A.J., BLUMBERG B.S.,
Australia antigen and acute viral hepatitis
Ann. Intern. Med. 70, 55 - 59, 1969

101. LÜRMAN A.,
Eine Icterusepidemie
Berl. Klin. Wschr. 22, 20 - 23, 1885

102. Mc. COLLUM F.O., BRADLEY W.H.,
Transmission of infective hepatitis to human volunteers
Lancet II, 228 - 232, 1944

103. Mc. COLLUM F.O.,
Early studies in Viral Hepatitis
Brit. Med. Bull. 28, 105 - 108, 1972

104. Mc. AULEY C.B.,
Nonparenteral transmissionof hepatitis B
Transfusion 13, 337, 1973

105. MADHAVAN T., QUINN E.,
Transmission of Hepatitis
J. Amer. med. ass. 224, 627 - 628, 1973

106. MAGNIUS L.O., ESPMARK A.,
A new antigen complex cooccuring with Australia antigen
Acta path. microbiol. scand. Section B, 80, 335 - 337, 1972

107. MARSTON R.Q.,
Clinical aspects of viral hepatitis-Inauguralremarks in
Hepatitis and blood transfusion,
Grune and Stratton 1972

108. MAY G., GERLICH W.,
Quantitative determination of hepatitis associated
antigen
Zbl. Bakt. Hyg. Orig. A 221, 12 - 18, 1972

109. MEYER zum BÜSCHENFELDE K.H., BOLTE J.P.,
Hepatitis Risiko durch Blut und Blutprodukte und
Möglichkeiten einer Hepatitis-Prophylaxe
Internist 15, 471 - 478, 1974

110. MILLER W.V., HOLLAND F.V., WALSH J.H., WATSON L.F.,
Evaluation of the effectiveness of hepatitis screening
tests
Vox sang 21, 1 - 10, 1971

111. MILLMAN J., HUKTANEN H., MERINO F., BAYER M.E., BLUMBERG
B.S.,
Australia antigen : physical and chemical properties
Bact. Proc. 176 f, 1971

112. MIRICK G.S., SHANK R.E.,
An epidemic of serum hepatitis,Studies under controlled
conditions
Trans. Amer. Clin. Climat. Assoc. 71, 176 - 190, 1959

113. MOLINARI E., EDER G.,
Optimising reagents for Au/SH hepatitis associated
antigen screening
Progress Immunbiol. Stand. 5, 33 - 37, 1972

114. MOORE B.P.L., MEADE D.,
Counterimmunoelectrophoresis for detection of
hepatitis B antigen and antibody: a technique for
large scale use.
Can. J. Public. Health, 63, 453 - 459, 1972

115. MORBIDITY and mortality weekly report,
US Public health service 21, 194, 1972
Immun serum globulin for protection against viral hepatitis

116. MOSLEY J.W.,
The surveillance of transfusion associated viral hepatitis
J. Amer. med. ass. 193, 1 007 - 1 010, 1965

117. National Academy of Sciences, Committee on Viral Hepatitis
Public health implications of the presence of hepatitis B antigen in human serum
Morbidity and mortality weekly report US Public Health Service

118. National Academy of Sciences
Nomenclature of antigens associated with viral hepatitis type B
J. Infect. Dis. 130, 92 (1974)

119. National Dialysis Registry
Statistical analysis on reporting US dialysis centers
Bethesda Artificial kidney - chronic uremia program
National Institutes of Arthitis and Metabolic Diseases

120. NEEFE J.E., STOKES J., REINHOLD J.G.,
Oral administration to volunteers of feces from patients with homologous serum hepatitis and infectious (epidemic) hepatitis,
Amer. J. med. Sci. 210, 29 - 32, 1945

121. NELSON M., PHIPPS E., WATSON P.G., WATTS J.R., ZWOLENSKI R.,
Automated passive hemagglutination technique suitable for the detection of hepatitis B virus antigen and antibody in blood donors
J. Clin. Path. 26, 343 - 350, 1973

122. NIELSON J.P., DIETRICHSON O., ELLING P., CHRISTOFFERSON P.,
Incidence and meaning of persistance of Australia antigen in patients with acute hepatitis; development of chronic hepatitis
N Engl. J. Med. 285, 1 157 - 1 160, 1971

123. NISHIOKA K.,
Immune adherence hemagglutination for detection of Australia antigen
Amer. J. Dis. Child 123, 406 f, 1972

124. OKOCHI K., MURAKAMI S.,
Observations on Australia antigen in Japanese
Vox sang. 15, 374 f, 1968

125. OKOCHI K., MURAKAMI S., NINOMIYA K., KANEKO M.,
Australia antigen, transfusion and hepatitis
Vox sang. 18, 289 - 300, 1970

126. OKOCHI K., MAYUMI M., HAGUINO Y. et al.,
Evaluation of Frequency of Australia antigen in blood donors of Tokyo by measurement of immune adherence hemagglutination technique
Vox. sang. 19, 332 - 327, 1970

127. OUCHTERLONY Ö.,
Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis
Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan 1968

128. PARSONS F. M. et al.,
Combined report of regular dialysis and transplantation in Europe
Proc. Eur. Dial. Transpl. Assoc. 8, 3 - 27, 1971

129. PAUL J.R., HAVEN W.P., SABIN A.B.,
Transmission experiments in serum jaundice and infectious hepatitis
J. Amer. med. ass. 128, 911 - 915, 1945

130. PESENDORFER F., KRASNITZKY O., WEWALKA F.,
Immunelektrophoretischer Nachweis von Hepatitis - associated antigen
Klin. Wschr. 48, 58 - 59, 1970

131. PETERSON D.A., FRÖSNER G.G., DEINHARDT F.,
Evaluation of passive hemagglutination, solid phase radioimmunoassay and immunelectrophoresis for the detection of hepatitis B antigen
Appl. Microbiol. 26, 376 - 380, 1973

132. PORCHER, H.,
HB_sAg Workshop in Frankfurt, Januar 1976
Selecta 16, 1 512 - 1 517, 1976

133. PORTOCALA R., POPA L.M., REPANOVICI R.,
Some physico-chemical properties of Australia antigen investigations by gel filtration, polycrylamide and agarose gel electrophoresis, adsorption and specific preparation
Acta virol. 16, 191 - 200, 1972

134. PRINCE A.M.,
An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60, 814 - 821, 1968

135. PRINCE A.M.,
Relation of Australia and SH antigens
Lancet II, 462, 1968

136. PRINCE A.M., LEBLANC L., KROHN K., MASSEYEFF R., ALPERT M.E.,
SH antigen and chronic liver disease
Lancet II, 717, 1970

137. PRINCE A.M.,
Detection of serum hepatitis virus carriers by
testing for the SH (Australia) antigen
Vox sang. 19, 417 - 424, 1970

138. PRINCE A.M., BURKE K.,
Serum hepatitis antigen: rapid detection by high
voltage immunoelectrophoresis
Science 169, 593 - 595, 1970

139. PRINCE A.M., BROTMAN B., IKRAM H.,
Diskussion zu Vyas et al.: Detection of Hepatitis B Antigen and antibodies by Hemagglutination assay
in: VYAS G.N., PERKINS H.A., SCHMID R.: Hepatitis and
Blood Transfusion, Grune and Stratt on NY, 1972

140. PRINCE A. M., BROTMAN B., CHERUBIN C.,
Immune response in patients who received blood
containing serum hepatitis antigen
Amer. J. Dis. Child. 123, 415 - 418, 1972

141. PRINCE A.M., BROTMAN B., JASS D., IKRAM H.,
Specifity of the direct solid-phase radioimmunoassay
for detection of Hepatitis B antigen
Lancet II, 1 346 - 1 350, 1973

142. PROPERT S.A.,
Hepatitis after prophylactic serum
Brit. med. J. 2, 677 f, 1938

143. PURCELL R.H., HOLLAND P.V., WALSH J.H., WONG D.C., MORROW A.G.
CHANOCK R.M.,
A complement fixation test for measuring Australia
antigen and antibody
J. Infect. Dis. 120, 383 - 386, 1969

144. REED W.D., EDDLESTON A.L.W.F., WILLIAMS R.,
Immun pathology of viral hepatitis in man
Progr. med. Virol. 17, 38 - 76, 1974

145. REINICKE V., DYBKJAER E., RØLSEN H., BANKE O., LYLOFF K.,
NORDENFELD E.,
Transmission of hepatitis : role of liver disease
in Australia antigen positive donors
N Engl. J. Med. 286, 867 - 870, 1972

146. REINICKE V., BANKE O., DYBKJAER E.,
Australia antigen and posttransfusion-hepatitis
Vox sang. 24, 65 - 71, 1973

147. RENGER F., REIMANN W., FRANK K.H., TSCHÖPEL L.,
Über die Häufigkeit von Antigen und Antikörper zum
Hepatitis B Virus in Dialysezentren der DDR
Dtsch. Ges. wesen 29, 58 - 61, 1974

148. ROBINSON W.S., CLAYTON D.A., GREENMAN R.,
DNA of a human hepatitis B virus candidate
J. Virol. 14, 384 - 391, 1974

149. SAUER H.J., SCHMIDT H.J., SCHÄFER E.,
Zur Problematik des Nachweises von Hepatitis B
Antigen.
Wehrmed. Monatsschrift 17, 129 - 135, 1973

150. SAWYER W.A., MEYER K.E., EATON M., BAUER J.H., PUTNAM P.,
SCHWENTHER F.F.,
Jaundice in army personnel in the western region
of the USA an its relation to vaccination against
yellow fever
Amer. J. Hyg. 40, 35 - 107, 1944

151. SCHÄUBLE Rosemarie,
Untersuchung über die Empfindlichkeit und Spezifität
einer neuen Radioimmunmethode (Ausria II 125) zum
Nachweis des Hepatitis B surface Antigen.
Inauguraldissertation klin. Med. Tübingen, 1975

152. SCHMIDT N., LENNETTE E.,
Complement fixation and immunodiffusion tests for assay
of hepatitis-associated "Australia" antigen and antibodies
J. Immunol. 105, 604 - 613, 1970

153. SCHNEIDER W., SUGG U., FRÖSNER G.G., SCHÄUBLE R., SCHEERER
U.,
Eine neue Radioimmunmethode im Vergleich zu anderen
Nachweismethoden des Hepatitis-B-Antigens
Med. Welt, 25, 1 934 - 1 938, 1974

154. SCHOBER A., SUNDMACHER R., THOMSSEN R., DREES O.,
Sedimentation constant of hepatitis associated antigen
Arch. ges. Virusforsch. 35, 314 ff, 1971

155. SCHOBER A., THOMSSEN R.,
Natur und Nachweis des Hepatitis B- (Australia) -Antigens
und seines Antikörpers
Internist, 14, 546 - 553, 1973

156. SCHUURS A., KACAKI J.,
Passiver Hämagglutinationstest zur Bestimmung von Hepatitis B Antigen
Abstracta 9 th International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Athen 14 - 21, Oktober 1973

157. SEIDL S., PADE K., KALTSCHMID O.,
Der Nachweis von Hepatitis B Antigen bei Blutspendern durch die passive Hämagglutination
Klin. Wschr. 29, 599 - 601, 1974

158. SOURIS J.T.,
Limitations of the radioimmunoassay for hepatitis B antigen
N Engl. J. Med. 288, 160 - 161, 1973

159. SHERLOCK S., FOX R.A., NIAZI S.P., SCHEUER P.J.,
Chronic liver disease and primary liver cell cancer with hepatitis associated (Australia) antigen in the serum
Lancet I, 1 243 - 1 247, 1970

160. SHULMAN N.R., BARKER L.F.,
Virus like antigen, antibody and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complementfixation
Science 165, 301 - 306, 1969

161. SHULMAN N.R., HIRSCHMAN R.J., BARKER L.F.,
Viral hepatitis
Annuals of Int. Med. 72, 257 - 269, 1970

162. SPIES K., ALVERMANN B., STEINRÜCK H.,
Current views on the etiology of virus hepatitis
Dtsch. Z. Verdau- u. Stoffwechselkr., 32, 11 - 16, 1972

163. SUGG U.,
Voraussetzungen, Optimierung und Ergebnisse einer elektrophoretischen Schnellmethode zum Nachweis des HB_sAg
Inaugural-Dissertation Klin. Medizin, Tübingen, 1975

164. SUTNICK A.I., LONDON W.T., GERSTLEY B.J.S., CROUMUD M.M., BLUMBERG B.S.,
Anicteric hepatitis associated with Australia antigen. Occurence in patients with Dowen's syndrome
J. Amer. med. ass. 25, 670 - 674, 1968

165. SZMUNESS W., PRINCE A.M., GRADY F.G., MANN M.K., LEVINE R.W. et al.,
Hepatitis B infection
J. Amer. med. ass. 227, 901 - 906, 1974

166. TAYLOR P.,
Laboratorytests for Australia (Hepatitis-associated) antigen and antibody
Br. med. bull, 28, 138 - 141, 1972

167. TAYLOR P., ALMEIDA J.D., ZUCKERMAN A.J., LEACH J.M.,
Relationship of Milan antigen to abnormal serum lipoprotein
Amer. J. Dis. Child, 123, 329 - 331, 1972

168. THAMER G., KOMMERELL B.,
Methoden zum Nachweis des Australia-Antigens
Diagnostik 6, 631 - 6 35, 1973

169. THAMER G.,
Das Australia-Antigen und seine klinische Bedeutung
Dtsch. med. Wschr. 99, 711 - 715, 1974

170. TURNER G.C., WHITE G.B.B.,
SH antigen in hemodialysis associated hepatitis
Lancet II, 121 - 124, 1969

171. VYAS G.N., SHULMAN N.R.,
Hemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis
Science 170, 332 - 333, 1970

172. VYAS G.N., WILLIAMS E.W., KLAUS G.G.B., BOND H.E.,
Hepatitis associated Australia antigen: Protein, peptides and aminoacid composition of purified antigenwith its use in determining sensitivity of the hemagglutination test
J. Immunol. 108, 1 114 - 1 118, 1972

173. VYAS G.N., MASON M.A., WILLIAMS E.W.,
Detection of Hepatitis B antigen and antibodies by hemagglutination assay.
in: VYAS G.N., PERKINS H.A., SCHMID R.: Hepatitis and Blood Transfusion, Grune and Stratton NY, 1972

174. VYAS G.N.,
Hepatitis B antigen and antibodies: detection by hemagglutination assay
Amer. J. Med. Technol. 38, 366 - 369, 1972

175. WALSH J.H., YALOW R., BERSON S.A.,
Detection of Australia antigen and antibody by means of radioimmunoassay techniques
J. Inf. Dis. 121, 550 - 554, 1970

176. WARD R. et al.,
Infectious hepatitis : studies of its natural history and prevention
N Engl. J. Med. 258, 407 - 416, 1958

177. WEBER K.B., GRO: P.J.,
Australia Antigen und "Hepatitis" in Hämodialysezentren
Schweiz. med. Wschr. 108, 529 - 534, 1972

178. WEISE H.J.,
Zur Bedeutung des Hepatitis B-Antigennachweises für die Hepatitis-Bekämpfung
Bundesgesundheitsblatt 20, 305 - 308, 1974

179. WEWALKA F., KRASNITZKY O., PESENDORFER F.,
Report of a proficiency test for hepatitis B antigen
Vox sang, 25, 88 - 95, 1973

180. WILLCOX W.H.,
Lettsomian lectures. On jaundice with special reference to types occuring during the war
Trans. med. soc. Lond. 42, 147 - 167, 1919

181. World Health Organization, Consultation on Viral hepatitis
Viral hepatitis and test for the Australia (Hepatitis associated) antigen and antibody
Bull. Wld. Hlth. org. 42, 957 - 992, 1970

182. World Health Organization
Viral hepatitis. Report of WHO scientific group
Tech. Report. Ser. Wld. Hlth. Org. 518, 1973

183. World Health Organization Scientific group
Clinicalimmunology, report of a WHO Scientific group
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 42, Suppl. 1 - 50, 1972

184. World Medical Associatsion Draft Code of Ethics on Human Experimentation
Brit. Med. J. 2, 119 f, 1962

185. WRIGHT R., Mc COLLUM R.W., KLATSKIN G.,
Australia antigen in acute and chronic liver disease
Lancet II, 117 ff, 1969

186. ZUCKERMAN A.J.,
Australia antigen, an antigen associated with viral hepatitis
Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 33, 113 ff, 1972

187. ZUCKERMAN A.J., Collective study : Post-transfusion hepatitis in a London hospital. Results of a two year prospective study.
J. Hyg. (Camb.) 73, 173 f. (1974)

Herrn Professor Dr. W. Schneider danke ich für die Überlassung der Arbeit und für die große Geduld bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Sugg und Herrn Dr. Frösner danke ich für die freundliche Betreuung während der Laborarbeiten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Frau Linder und ihren Helferinnen in der Blutzentrale, die mir trotz der großen Enge des Labors stets freundlich entgegenkamen und mir manchen wertvollen Rat gaben.

Lebenslauf

Name: Scheerer, geb. Pittroff, Ursula

Geboren: 25.01.1951 in München

1961-69: Gymnasium Idar-Oberstein

1969-75: Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen, ab 1970 zusätzlich Studium der Soziologie an der Universität Tübingen

16.12.75 Staatsexamen

1976 : 4 Monate chirurgische Medizinalassistentenzeit an den Städtischen Krankenanstalten Idar-Oberstein

ab Oktober Innere Medizinalassistentenzeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Tübingen

Familienstatus: verheiratet, 2 Kinder